

# **EVOLUCIÓN EXPERIMENTAL DE LA GAMA DE HUÉSPEDES DEL *Virus del grabado del tabaco* (TEV)**

---

**Presentado por:**  
**Sandra Patricia Agudelo Romero**

**Dirigida por los doctores**  
**Santiago F. Elena Fito,**  
**Profesor de Investigación del CSIC**

**Rafael Sanjuán Verdeguer,**  
**Investigador del Programa *Ramón y Cajal***

Valencia, 2009





MINISTERIO  
DE CIENCIA  
E INNOVACIÓN



INSTITUTO DE BIOLOGIA  
MOLECULAR Y CELULAR  
DE PLANTAS "Primo Yúfera"

València, 2 de Marzo de 2009

Santiago F. Elena Fito, Profesor de Investigación del CSIC, y Rafael Sanjuán Verdeguer, Investigador Postdoctoral del Programa Ramón y Cajal.

### **CERTIFICAN**

Que la presente memoria titulada "*Evolución experimental de la gama de huéspedes del Virus del grabado del tabaco (TEV)*" ha sido realizada por Dña. Sandra Patricia Agudelo Romero, bajo nuestra dirección en el Instituto de Biología Molecular de Plantas (IBMCP, CSIC-UPV); y constituye la memoria de Tesis para optar al grado de Doctor por la Universidad Politécnica de Valencia.

Y para que así conste a todos los efectos oportunos, firman el presente certificado en Valencia, a 2 de Marzo de dos mil nueve.

Fdo. Santiago F. Elena Fito

Fdo. Rafael Sanjuán Verdeguer

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA  
DE VALENCIA  
AVDA. DE LOS NARANJOS S/N  
46022-VALENCIA, ESPAÑA  
TEL.: +34 (9)6 387 78 56  
FAX: +34 (9)6 387 78 59  
<http://www.ibmcp.upv.es>



Esta tesis doctoral ha sido realizada con la financiación de los proyectos: (1) BMC2003-00066 “Evolución experimental de plantas: Caracterización de efectos mutacionales e implicaciones evolutivas de la segmentación genómica” (2003 – 2006). (2) BFU2006-14819-C02-01/BMC “Evolución experimental de virus vegetales: mutaciones deletéreas, mecanismos de robustez genómica y evolución de la interacción con los mecanismos de defensa de la planta” (2006 – 2009). Concedidos por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (MEC).

La realización de esta tesis también ha sido financiada gracias a la concesión de una beca predoctoral de Formación de Personal Investigador (FPI) BMC2003-00066 del Ministerio de Educación y Ciencia (2004-2008).



A mis padres, Guillermo y Betty

*Por brindarme su fortaleza*

A mis hermanos, David y Alejandro

*Por regalarme su alegría*

A mi abuela, Rufina

*Por ofrecerme todo su cariño*





***“Sólo una cosa vuelve un sueño imposible:  
el miedo a fracasar”***

Paulo Coelho



## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer de todo corazón a mi Director de Tesis, Prof. Santiago F. Elena Fito, por haberme dado la oportunidad de pertenecer a su grupo de investigación, por la paciencia que me ha tenido durante todos estos años y todo lo que me ha enseñado en ese tiempo, porque ahora, aparte de ser una mejor profesional, también soy una mejor persona. También quiero agradecer a mi Codirector el Dr. Rafael Sanjuán Verdeger, quien ha sido durante este tiempo un ejemplo a seguir y quien despertó en mí, el arte de la reflexión, el porqué de las cosas, que mucho me hacía falta.

A los Doctores José Antonio Darós y Miguel Ángel Pérez, por brindarme un poco de sus conocimientos y colaborar tan estrechamente con el desarrollo de esta Tesis.

A las personas que están y han pasado por nuestro laboratorio, porque siempre estarán en mi corazón. A Paqui, porque ha sido un pilar muy importante en el desarrollo de esta Tesis, por todas esas horas de invernadero, por ser tan buena y entrañable; Puri, que siempre tuvo tiempo para mí y me enseñó tantas cosas; Susana, que le dio el toque de alegría al labo; Paco, que siempre nos deleitó con sus historias; Clara que nos dio el punto de vista punki y ecologista; Ana la andaluza, con la que aprendí nuevas palabras y expresiones; Jasna, Nico, Guillaume y Alex que son el aporte croata-francés, que le brindan el toque exótico e internacional al labo; y por último “los ingenieros” Javi y Guillermo, que hacen seamos un grupo multidisciplinar.

Gracias a todos los servicios técnicos del IBMCP. A las personas que componen el Invernadero, lugar donde pase tanto tiempo, a Rafa, Toni, Carmen, Carlos y en especial a Nacho, que siempre estuvo dispuesto a ayudarnos con nuestra huerta. En Secuenciación, con Eugenio y Ana, tan exigentes y eficientes. En microscopía, MD, que nos regalaba esa sonrisa por los pasillos. Los informáticos, Ramón y Alexis, los más solicitados y perseguidos. Nuestra Bibliotecaria, Assumpta, siempre dispuesta a ayudarnos. Ana Mira, nuestra amable y eficaz Secretaria. Y por último, pero no menos importantes, Santiago y José, los manitas del Instituto.

También quiero dar las gracias a Rosita, porque me recibió en su casa, me abrió las puertas de su corazón, me brindó su amistad y me acogió como si fuera parte de su familia. Por esas comidas, tardes de tertulia y sobre todo por sus sabios consejos.

Durante todo este tiempo, he sido una persona muy afortunada por tener grandes amigos como Francy, Juan, Lina, Claudia y Diego M, que me escucharon, ayudaron y sostuvieron en los momentos difíciles. A Matilde, Moni, Judith, Diego V, Lili, Neddy, Carolina A, Carolina G y Jaime, que sé que siempre contaré con ellos y ellos siempre contarán conmigo.

Por todas esas risas, con los auto nombrados “Señores del Desconsejo” Jorge, Emilio, Vicente, Hugo, Antonio y Pedro, y las chicas María Ángeles, Marina y Aurora. Por todos esos buenos momentos compartidos con mis compis de piso Pablo y Carol. Muchas gracias!

A lo mejor que me ha pasado en España, a mi novio José Antonio, al que no tengo palabras para agradecer su apoyo y cariño, incondicional. A mi segunda familia Basi, Javier, Vale y Vero, quienes también han sido un apoyo constante.

A las personas más importantes de mi vida, mi familia, a quienes tuve que dejar (tan sólo en la distancia, nunca en mi corazón y mis pensamientos), para perseguir un sueño. A ellos les dedico este pequeño triunfo.

## ÍNDICE GENERAL

---



# ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	i
ÍNDICE DE TABLAS .....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS .....	iv
RESUMEN .....	v
ABSTRACT .....	ix
RESUM .....	xiii
ABREVIATURAS.....	xvii
INTRODUCCIÓN .....	1
I.1. Generalidades sobre el <i>Virus del grabado del tabaco</i> (TEV).....	5
I.2. El sustrato sobre el que actuará la selección natural: la variación genética.....	7
I.2.1. <i>Recombinación</i> .....	8
I.2.2. <i>Mutación</i> .....	8
I.3. Las fuerzas del cambio evolutivo .....	9
I.3.1. <i>Deriva genética</i> .....	10
I.3.2. <i>Selección</i> .....	11
I.4 La evolución de la virulencia .....	13
I.5. Interacciones patógeno-huésped: respuestas de defensa de la planta .....	14
I.6. Estudios de expresión génica .....	16
OBJETIVOS.....	21
PARTE I .....	25
Capítulo 1. Coste pleiotrópico de la especialización a un huésped por el <i>Virus del grabado del tabaco</i> .....	25
PARTE II .....	37
Capítulo 2. Cambios en el perfil de expresión génica de <i>Arabidopsis thaliana</i> después de la infección por el <i>Virus del grabado del tabaco</i> .....	37
Capítulo3. Adaptación del <i>Virus del grabado del tabaco</i> a <i>Arabidopsis thaliana</i> por manipulación de la expresión génica del huésped. ....	51
Capítulo 4. Relación entre la adaptación del <i>Virus del grabado del tabaco</i> al ecotipo susceptible <i>Arabidopsis thaliana</i> Ler-0 y la infectividad en ecotipos no susceptibles.....	61
DISCUSIÓN GENERAL.....	69
D. 1. Coste de la ampliación de la gama de huéspedes de TEV en especies relacionadas .....	71
D.1.1 <i>Efectos pleiotrópicos</i> .....	71

D.2. Coste de la ampliación de la gama de huéspedes de TEV a especies filogenéticamente alejadas: el caso de <i>Arabidopsis thaliana</i> . ....	74
D.2.1. Análisis del perfil transcripcional de <i>Arabidopsis thaliana</i> Ler-0 infectada con TEV. ....	74
D.2.2. Cambios en el patrón de expresión génica de la planta tras la adaptación de TEV. ....	77
D.2.3. Infectividad de TEV-At17 en distintos ecotipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> : efecto de la heterogeneidad genética de la población de huéspedes en la emergencia viral. ....	80
CONCLUSIONES .....	83
BIBLIOGRAFÍA .....	87

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción de las características de las proteínas virales que codifican el genoma de TEV.....	6
Tabla 2. Clasificación taxonómica de los diferentes huéspedes empleados en esta tesis y síntomas producidos por TEV.....	7
Tabla 3. Selección de trabajos que emplean diferentes metodologías para el estudio de la expresión génica en respuestas a la infección viral. ....	18
Tabla 4. Patrones de expresión génica de plantas infectadas con el TEV ancestral y TEV-At17 agrupados en mapas de auto-organización (SOM).....	79

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación taxonómica del <i>Virus del grabado del tabaco</i> (TEV). ....	5
Figura 2. Organización del genoma de TEV.....	6
Figura 3. Respuestas del huésped y la alteración de los patrones de expresión de génica asociada a la infección viral en plantas. ....	16



## RESUMEN

---



## RESUMEN

**E**n la actualidad, la aparición o emergencia de nuevos virus de plantas representa una amenaza directa para la agricultura. La incidencia de nuevos virus de plantas aumenta debido a cambios en el medio ambiente y a malas prácticas agrícolas. Por esto, es importante determinar los factores genéticos y evolutivos implicados en la aparición de estos nuevos virus. Los virus de RNA son excelentes modelos experimentales para el estudio de procesos evolutivos en escalas temporales imposibles con otros organismos modelos pluricelulares. Esta rápida evolución es consecuencia de sus genomas compactos, elevadas tasas de mutación, rápidas tasas de replicación y enormes tamaños poblacionales que, en conjunto, generan poblaciones tremendamente polimórficas. Esta enorme variabilidad es clave para entender la patogenicidad en sus huéspedes. Trabajar con virus de plantas permite el uso de huéspedes reales sin las incomodidades de manejo ni las implicaciones éticas propias de los virus de animales. Aprovechando las ventajas que nos ofrece el estudio de la evolución experimental con virus de RNA de plantas, en este trabajo perseguimos adquirir conocimientos básicos sobre la evolución de la interacción virus-huésped, y qué factores condicionan la gama de nuevos huéspedes de un virus, lo cual puede determinar potencialmente el fenómeno de emergencia viral. El objetivo fundamental de esta Tesis es simular un proceso de emergencia viral.

En general, los virus de plantas muestran una alta variabilidad en sus gamas de huéspedes: mientras algunos infectan sólo una o pocas especies afines (especialistas), otros pueden infectar un amplio rango e incluso especies pertenecientes a grupos taxonómicos diferentes (generalistas). En un primer conjunto de experimentos exploraremos el coste que en términos de eficacia viral supone la ampliación de la gama de huéspedes del *Potyvirus del grabado del tabaco* (TEV). Estos estudios los realizaremos a dos niveles. En primer lugar empleando huéspedes pertenecientes a la misma familia taxonómica (tabaco y pimiento). En segundo lugar, en huéspedes pertenecientes a familias taxonómicas muy alejadas (tabaco y arabidopsis). Estos experimentos muestran que la adaptación a un nuevo huésped tiene un efecto pleiotrópico antagonista en el huésped original. Estos resultados nos permiten concluir que ampliar la gama de huéspedes implica un coste en términos de eficacia promedio, de manera que la eficacia viral no se maximiza para cada huésped sino que existe un compromiso.

En un segundo conjunto de experimentos, hemos pretendido explorar si la adaptación del virus a arabidopsis conlleva cambios en el tipo de interacciones que éste establece con la

planta a nivel del transcriptoma. Más concretamente, las preguntas que perseguimos responder son dos: (1) ¿Qué cambios se observan en el patrón de expresión génica en el huésped tras la infección con un virus emergente, en este caso TEV? (2) Una vez identificados los genes o rutas metabólicas afectadas por un genotipo de TEV no adaptado a *arabidopsis*, es el momento de preguntarse si esta red de interacciones cambia a medida que el virus se adapta a su nuevo huésped. Para desarrollar este trabajo utilizamos micromatrices de cDNA de alta densidad (26173 genes y 87 microRNAs), que nos permiten monitorizar cientos de genes al mismo tiempo de manera adecuada y eficiente. Hemos identificado un conjunto de genes de la planta cuya expresión se ve alterada por la infección con TEV, muchos de ellos implicados en respuesta a estreses bióticos y abióticos. Este conjunto de genes cambió a medida que el virus se adaptó a su nuevo huésped aumentando su eficacia y virulencia, observándose que muchos genes de respuesta a estrés biótico dejaron de ser activados tras la infección. Estos cambios tan acusados fueron consecuencia de un número limitado de mutaciones en el genoma de TEV. De hecho, un solo cambio en una proteína clave del virus era el responsable de los nuevos síntomas en la planta.

Por último, hemos querido comprobar si la adaptación de TEV al ecotipo de *arabidopsis* elegido para los experimentos arriba descritos (*Ler-0*) implica también un aumento de su eficacia y virulencia en otros ecotipos. Dicho de otra manera, si la adaptación viral es específica de un genotipo del huésped o si, por el contrario, facilita el acceso del virus a otros genotipos. Existe un buen número de grados de susceptibilidad a TEV en *arabidopsis*. Trabajos previos del grupo del Prof. J. C. Carrington mostraron que esta variabilidad es consecuencia del alelo dominante presente en un locus llamado *RTM1* (*restricción del movimiento de TEV 1*). Hemos evaluado 9 ecotipos diferentes de *arabidopsis* con diferentes niveles de susceptibilidad a TEV. Hemos observado que el virus adaptado a *Ler-0* era capaz de infectar y generar síntomas en ecotipos que eran resistentes a la infección con el TEV ancestral. Estos resultados sugieren que poseer el alelo de resistencia en el locus *RTM1* no es condición suficiente para que la planta sea resistente a TEV.

## ABSTRACT

---



# ABSTRACT

In recent years, the emergence of new plant viruses represents a direct threat to agriculture. The incidence of new plant viruses increases due to changes in the environment and poor agricultural practices. For this reason, it is important to determine the genetic and evolutionary factors involved in the emergence of new viruses. RNA viruses are excellent experimental models for the study of long term evolutionary processes in the which are impossible to address with pluricellular model organisms. Viruses present compact genomes, high rates of mutation, rapid replication and huge population sizes. All these factors contribute to a tremendous evolutionary because they all generate extremely polymorphic populations. Such variability is also a key factor to understand the pathogenic effects in their hosts. Working with plant viruses allows us to use real hosts without the inconveniences and ethical implications of the use of viruses from animals. Taking advantage of the benefits of using RNA plant viruses for experimental evolution studies, this work was seeking for basic knowledge about the evolution of the virus-host interaction and what factors determine the range of new host of a virus and that can determine a thus, hypothetical viral emergence. The main goal of this Thesis is to simulate a process of viral emergence.

In general, plant viruses show high diversity of range hosts. Specialists infect only one or a few related species, whereas generalists can infect a wide range of hosts, even belonging to different taxonomic groups. In the first set of experiments we will explore the fitness cost involved in the expansion of the host range of *Tobacco etch virus* (TEV). These studies will be done at two levels. First, using hosts that belong to the same family (tobacco and pepper). Second, hosts that belong to different family taxonomic families (tobacco and arabidopsis). These experiments will show us that adaptation to the new host has antagonistic pleiotropic effects in the original host. These results allow us to conclude that the expansion of hosts range implies a cost in terms of average fitness throughout the whole host range. Fitness is not maximized for every host. Instead, there is an evolutionary trade-off.

In the second set of experiments, we will explore whether adaptation to *A. thaliana* involves changes in the type of interactions with the plant transcriptome. Specifically, we seek to answer two questions: (1) What changes are observed in the pattern of gene expression in the host after infection with an emerging virus, in this case TEV? (2) Once the genes or metabolic pathways that are affected by a genotype that was not adapted to arabidopsis have been identified, it is time to ask whether this network of interactions changes when the virus

adapts to its new host. To develop this work we used high-density cDNA microarrays (26173 protein-coding gene transcripts and 87 miRNAs) providing a quantitative description of the behavior of hundreds of genes at the same time in an adequate and efficient manner. We have identified a set of genes whose expression in the plant is altered by infection with TEV. Many are involved in responses to biotic (systemic acquired resistance and innate immune response) and abiotic stresses. This set of genes changed when the virus was adapted to the host and we found that many of the genes which are normally activated in response to biotic stress were not active after infection. These changes in the interaction with the host are correlated with a dramatic increase in fitness and viral virulence. Changes in the interaction with the host were the result of a few mutations in the genome of TEV. In fact, a single amino acid replacement in a protein of the virus was responsible for the new symptoms in the plant.

Finally, we wondered whether adaptation of TEV to the ecotype chosen for the experiments described above (*Ler-0*) also involved an increase in fitness and virulence in other ecotypes. In other words, we wanted to determine whether adaptation of a viral genotype is host-specific or if, by contrast, facilitates the colonization of genetically related hosts. A great number of arabidopsis accessions is available, with different levels of susceptibility to TEV. Previous works by the group of Prof. J. C. Carrington showed that variability in susceptibility is a consequence of the dominant allele called *RTM1* (*restricted TEV movement 1*). We have assessed nine different arabidopsis ecotypes with different levels of susceptibility to TEV and we have observed that the virus adapted to *Ler-0* was able to infect and produce symptoms in ecotypes that were resistant to infection with the ancestral TEV. These results suggest that the presence of the allele of resistance in the locus *RTM1* is not enough to ensure that the plant is resistant to TEV. The outcome will depend on the viral genotype.



RESUM

---



## RESUM

**E**n l'actualitat, l'aparició o emergència de nous virus de plantes representa una amenaça directa per a l'agricultura. Els nous virus de plantes augmenten degut a canvis en el medi ambient i a males pràctiques agrícoles. Per aquest motiu, és important determinar els factors genètics i evolutius implicats en l'aparició de nous virus. Els virus de RNA són excel·lents models experimentals per a l'estudi de processos evolutius en escales temporals impossibles amb altres organismes model pluricel·lulars. Aquesta ràpida evolució és conseqüència dels seus genomes compactes, les seues elevades taxes de mutació, les ràpides taxes de replicació i les enormes mides poblacionals que, en conjunt, generen poblacions tremendament polimòrfiques. Aquesta enorme variabilitat esdevé clau per entendre la patogenicitat als seus hostes. Treballar amb virus de plantes permet l'ús d'hostes reals sense les incomoditats de manipulació ni les implicacions ètiques pròpies dels virus que infecten animals. Aprofitant els avantatges que ens ofereix l'estudi de l'evolució experimental amb virus de RNA de plantes, en aquest treball perseguim assolir coneixements bàsics sobre l'evolució de la interacció virus-hoste i quins factors condicionen la gamma de nous hostes d'un virus la qual cosa pot determinar potencialment el fenomen d'emergència viral. L'objectiu fonamental d'aquesta Tesi és simular un procés d'emergència viral.

En general, els virus de plantes mostren una alta variabilitat pel que fa a les seues gammes d'hostes: des d'alguns que infecten sols una o unes poques espècies afins (especialistes), fins d'altres que poden infectar un ampli rang i inclús espècies pertanyents a grups taxonòmics diferents (generalistes). En un primer conjunt d'experiments explorarem el cost que en termes d'eficàcia viral supossa l'ampliació de la gamma d'hostes del *Potyvirus del gravat del tabac* (TEV). Aquests estudis els realitzarem a dos nivells. En primer lloc emprant hostes pertanyent a la mateixa família taxonòmica (tabac i pebrot). En segon lloc, en hostes que pertanyen a famílies taxonòmiques molt allunyades (tabac i arabidopsis). Aquests experiments mostren que l'adaptació a un nou hoste té un efecte pleiotròpic antagonista a l'hoste original. Estos resultats ens permeten concloure que ampliar la gamma d'hostes implica un cost en termes d'eficàcia mitjana, de manera que l'eficàcia viral no és maximitzada per a cada hoste sinó que existeix un compromís.

A un segon conjunt d'experiments, hem pretès explorar si l'adaptació del virus a arabidopsis comporta canvis en el tipus d'interaccions que s'estableixen amb la planta a nivell del transcriptoma. Més concretament, les preguntes que perseguim respondre són dues: (1)

Quins canvis s'observen en el patró d'expressió gènica a l'hoste després de la infecció amb un virus emergent, en aquest cas TEV? (2) Una vegada identificats els gens o rutes metabòliques afectades per un genotipus de TEV no adaptat a arabidopsis, és el moment de preguntar-se si aquesta xarxa d'interaccions canvia a mesura que el virus s'adapta al seu nou hoste. Per desenvolupar aquest treball utilitzem micromatrius de cDNA d'alta densitat (26173 gens y 87 microRNAs), que ens permeten monitoritzar centenars de gens al mateix temps de manera adequada i eficient. Hem identificat un conjunt de gens de la planta l'expressió dels quals es veu alterada per la infecció amb TEV, molts d'ells implicats en la resposta a estressos biòtics i abiòtics. Aquest conjunt de gens va canviar a mesura que el virus s'adaptava al seu nou hoste augmentat la seua eficàcia i virulència, observant-se que molts gens de resposta a stres biòtic deixaren d'ésser activats després de la infecció. Aquests canvis tan acusats foren conseqüència d'un nombre limitat de mutacions en el genoma de TEV. De fet, un sol canvi en una proteïna clau del virus era el responsable dels nous símptomes de la planta.

Per últim, hem volgut comprovar si l'adaptació de TEV a l'ecotipus d'arabidopsis escollit per als experiments dalt esmentats (*Ler-0*) implica també un augment en la seua eficàcia i virulència en altres ecotips. Dit d'una altra manera, si l'adaptació viral és específica d'un genotipus de l'hoste, o si, pel contrari, facilita l'accés del virus a altres genotipus. Treballs previs del grup del Prof. J. C. Carrington mostraren que aquesta variabilitat és conseqüència de l'al·lel dominant present al locus anomenat *RTM1* (*restricció del moviment de TEV 1*). Hem avaluat nou ecotips diferents d'arabidopsis amb diferents nivells de susceptibilitat a TEV. Hem observat que el virus adaptat a *Ler-0* era capaç d'infectar i generar símptomes en ecotipus que eren resistents a la infecció amb el TEV ancestral. Aquests resultats suggereixen que posseir l'al·lel de resistència al locus *RTM1* no és condició suficient per a que la planta siga resistent a TEV.

## ABREVIATURAS

---



## ABREVIATURAS

<b>ABA:</b>	Ácido abscísico
<b>ACMV:</b>	<i>Virus africano del mosaico de la yuca</i>
<b>Alc-0:</b>	Alcalá de Henares
<b>Avr:</b>	Avirulencia
<b>BCTV:</b>	<i>Virus del encrespamiento de la remolacha</i>
<b>BMV:</b>	<i>Virus del mosaico del bromo</i>
<b>BSMV:</b>	<i>Virus del mosaico rayado de la cebada</i>
<b>CaMV:</b>	<i>Virus del mosaico de la coliflor</i>
<b>CMV:</b>	<i>Virus del mosaico del pepino</i>
<b>Col-0:</b>	Columbia
<b>Cvi-0:</b>	Isla Cabo Verde
<b>DME:</b>	Éter dimetílico
<b>DME:</b>	Gen <i>DEMETER</i>
<b>DNA:</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>dw:</b>	Peso seco
<b>EEEV:</b>	<i>Virus de la encefalitis equina del Este</i>
<b>eIF4E:</b>	Factor de inicio de la traducción 4E
<b>ET:</b>	Etileno
<b>FMDV:</b>	<i>Virus de la fiebre aftosa</i>
<b>fw:</b>	Peso fresco
<b>GO:</b>	Ontología génica
<b>h:</b>	Altura
<b>HCV:</b>	<i>Virus de la hepatitis C</i>
<b>HIV:</b>	<i>Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1</i>
<b>HR:</b>	Respuesta hipersensible
<b>HSC:</b>	Proteínas afines al choque térmico
<b>HSP:</b>	Proteínas de choque térmico
<b>IAV-H5N1:</b>	<i>Virus de la gripe aviar</i>
<b>INSV:</b>	<i>Virus del manchado necrótico de Impatiens</i>
<b>JA:</b>	Ácido jasmónico
<b>kb:</b>	Kilobase

---

<b>Ler-0:</b>	Lansberg <i>erecta</i>
<b>MAPK:</b>	Proteínas quinasas activadas por mitógeno
<b>MEA:</b>	Gen <i>MEDEA</i>
<b>miRNAs:</b>	micro RNA
<b>mRNA:</b>	RNA mensajeros
<b>MYMV:</b>	<i>Virus del mosaico amarillo del frijol mungo</i>
<b>NADPH:</b>	Dinucleótido fosfato de nicotiamida y adenina
<b>nm:</b>	Nanómetro
<b>ORF:</b>	Pauta de lectura abierta
<b>ORMV:</b>	<i>Virus del mosaico de la colza</i>
<b>Oy-0:</b>	Oystese
<b>PDV-1:</b>	<i>Morbilivirus causante del moquillo de las focas del Mar del Norte</i>
<b>PEBV:</b>	<i>Virus del oscurecimiento precoz del guisante</i>
<b>PepMV:</b>	<i>Virus del mosaico del pepino</i>
<b>PFBV:</b>	<i>Virus de la rotura del flor del clavel</i>
<b>PR:</b>	Proteínas relacionadas con la patogenicidad
<b>PSbMV:</b>	<i>Virus del mosaico del guisante transmitido por semilla</i>
<b>PSTVd:</b>	<i>Viroide del tubérculo fusiforme de la patata</i>
<b>PVC:</b>	<i>Virus C de la patata</i>
<b>PVX:</b>	<i>Virus X de la patata</i>
<b>PYV:</b>	<i>Virus Y de la patata</i>
<b>R:</b>	Resistencia
<b>RdRp:</b>	Polimerasa de RNA dependiente del RNA
<b>RNA:</b>	Ácido ribonucleico
<b>ROS:</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>RTM1:</b>	Restricción del movimiento de TEV 1
<b>RYMV:</b>	<i>Virus del moteado amarillo del arroz</i>
<b>SA:</b>	Ácido salicílico
<b>SAGE:</b>	Análisis de expresión génica
<b>SAR:</b>	Respuesta sistémica adquirida
<b>SARS-CoV:</b>	<i>Coronavirus responsable del Síndrome Respiratorio Agudo Severo</i>
<b>SOM:</b>	Mapas de auto-organización
<b>ssRNA (+):</b>	Virus de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva



<b>St-0:</b>	Estocolmo
<b>SYNV:</b>	<i>Virus del reticulado amarillo del sonchus</i>
<b>Ta-0:</b>	Tabor
<b>TEV:</b>	<i>Virus del grabado del tabaco</i>
<b>TF:</b>	Factores de transcripción
<b>TMV:</b>	<i>Virus del mosaico del tabaco</i>
<b>ToTV:</b>	<i>Virus del torrado del tomate</i>
<b>Tsu-0:</b>	Tsu
<b>TuMV:</b>	<i>Virus del mosaico del nabo</i>
<b>TVCV:</b>	<i>Virus de aclaramiento de las nervaduras del nabo</i>
<b>TVMV:</b>	<i>Virus del moteado de las venas del tabaco</i>
<b>UTR:</b>	Región no traducida
<b>VPg:</b>	Proteína viral de unión al genoma
<b>VSV:</b>	<i>Virus de la estomatitis vesicular</i>
<b>WCIMV:</b>	<i>Virus del mosaico del trébol blanco</i>
<b>WEEV:</b>	<i>Virus de la encefalitis equina del Oeste</i>
<b>Ws-0:</b>	Wassilewskija
<b>WSMV:</b>	<i>Virus del estriado del trigo</i>



## INTRODUCCIÓN

---



# INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas estamos siendo testigos de la emergencia de nuevos virus de RNA de gran importancia médica, veterinaria y agronómica. Se pueden citar como ejemplos de recientes virus emergentes al *Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1* (HIV-1), el *Virus de la hepatitis C* (HCV), más recientemente el coronavirus responsable del Síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV), el *Virus de la gripe aviar* (IAV-H5N1), el morbilivirus causante del Moquillo de las focas del Mar del Norte (PDV-1), el *Virus del torrado del tomate* (ToTV), o el *Virus del mosaico del pepino* (PepMV). Desde su aparición, estos virus han causado, en su caso, la muerte a un número elevado de personas en todo el mundo y en todo caso han generando alarma social, problemas sanitarios y cuantiosas pérdidas económicas. Sin embargo, desde un punto de vista de ciencia básica, los virus de RNA constituyen una poderosa herramienta para la realización de estudios de evolución experimental. Por su importancia clínica y socio-económica, el abordaje experimental a la evolución de virus ha estado claramente sesgado en favor de los virus animales, y especialmente al estudio de virus tales como: el *Virus de la estomatitis vesicular* (VSV) (Novella *et al.*, 2003), el *Virus de la fiebre aftosa* (FMDV) (Domingo *et al.*, 2003), y el HIV-1 (Yuste *et al.* 1999, 2000, 2005). Lamentablemente, la virología de plantas no se ha beneficiado de este enfoque experimental a la evolución en la misma medida, aunque existen notabilísimas excepciones (Ali *et al.*, 2006; Escriu *et al.*, 2007; Li y Roossinck 2004; Sacristán *et al.*, 2008).

En los años venideros, se espera que surjan nuevos virus de plantas debido a los cambios que estamos experimentando en el medio ambiente (calentamiento global, deforestación y nuevos biotipos de insectos vectores), sumados a las malas prácticas agrícolas (monocultivos intensivos, uso de cultivos genéticamente homogéneos y un mercado global no siempre respetuoso con las medidas básicas de seguridad alimentaria y de contención biológica), por lo que no se puede dejar en segundo plano el estudio experimental de la emergencia de virus de plantas. Estos estudios nos proveerán de las herramientas necesarias para evitar posible daños en la agricultura. Por esto, es esencial determinar los factores genéticos y evolutivos en la emergencia de nuevos virus de plantas.

La evolución experimental con virus de plantas permite trabajar con huéspedes\* reales de manera más fácil, sin las serias dificultades de tipo ético inherentes a la experimentación

*Huésped desde el punto de vista biológico, es animal o vegetal que alberga o nutre a otro organismo (parásito). En este caso el virus usa al huésped para su reproducción.*

con virus animales. Otra ventaja de los virus de plantas es que permite estudiar la compleja relación entre el virus y su huésped eucariota multicelular, permitiéndonos aprender acerca de la interacción virus-huésped en un contexto biológico natural (Elena *et al.*, 2008), en comparación con los estudios clásicos, en virus animales, en los que el huésped está constituido por líneas celulares mantenidas en cultivo.

Los virus de RNA son excelentes modelos para el estudio experimental de la evolución por presentar características tales como: (1) Elevadas tasas de mutación, entre  $10^{-6}$  y  $10^{-4}$  cambios por nucleótido y evento de replicación (Drake *et al.*, 1999) consecuencia de la ausencia de actividades correctoras en las polimerasas del RNA dependientes de un molde de RNA (RdRp). (2) Genomas pequeños (en promedio tienen 10 kb; el más pequeño es un levivirus de 4 Kb y el más grande un coronavirus de 30 kb) (Belshaw *et al.*, 2008), por lo que algunos virus presentan pautas de lectura solapadas, que codifican proteínas multifuncionales. (3) Altas tasas de replicación, en las que se alcanzan poblaciones de gran tamaño tras un período corto de tiempo, después de la infección. (4) Gran variabilidad genética, que representa un factor clave en la patogenicidad (por ejemplo, mutantes de escape inmunitario, resistencia a drogas antivirales o ampliación de la gama de huéspedes). (5) Además, existe abundante información molecular, funcional y estructural sobre los virus, lo que hace relativamente fácil cartografiar cambios genotípicos en el espacio de fenotipos (Elena y Sanjuán, 2007).

La mejor manera de atajar la emergencia de nuevos virus de plantas es llegar al entendimiento de cómo se relacionan la estructura genética de las poblaciones virales y la evolución de la virulencia en sus huéspedes naturales y potenciales. Este conocimiento permitirá, eventualmente, desarrollar nuevos métodos para su control donde hasta ahora otros han fracasado debido a que las poblaciones virales sistemáticamente encuentran la manera, por ejemplo, de evadir los genes de resistencia introducidos en los cultivos. Con las técnicas de análisis genético actualmente disponibles, podemos analizar el comportamiento de las cepas virales, estudiando la manera en que interactúan con el huésped. Por ejemplo, podemos caracterizar los cambios acontecidos en el genoma viral como respuesta a la adaptación al nuevo huésped, y analizar por mutagénesis dirigida el efecto de cada una de estas mutaciones sobre el transcriptoma completo del huésped tras la infección viral para de esta forma, diseñar estrategias de control de un modo más racional y más robustas ante la inevitable evolución viral.

Para atacar este problema científico y beneficiarnos de las ventajas que nos ofrecen los virus de RNA de plantas en la evolución experimental, en este trabajo estudiaremos experimentalmente las dinámicas adaptivas del *Virus del grabado del tabaco* (TEV) como sistema modelo en huéspedes heterólogos. Monitorizaremos en tiempo real la evolución de la virulencia, los cambios genotípicos y fenotípicos de las poblaciones virales y cómo éstas evolucionan su interacción con la expresión génica del huésped.

### I.1. Generalidades sobre el *Virus del grabado del tabaco* (TEV)

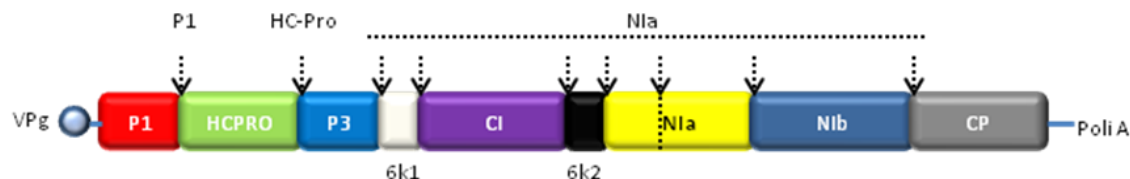
TEV es un miembro de la familia *Potyviridae*, la cual está compuesta por cinco géneros: *Potyvirus*, *Bymovirus*, *Rymovirus*, *Ipomovirus* y *Tritimovirus* (<http://www.virustaxonomyonline.com>). Los miembros del género *Potyvirus*, al que pertenece TEV, son transmitidos por áfidos de manera no persistente (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001; Reves *et al.*, 1999) y tienen la particularidad de formar cuerpos de inclusión, en forma de punta de alfiler, en el citoplasma de las células infectadas (Riechmann *et al.*, 1992). TEV, al igual que el resto de *Potyvirus*, se caracteriza por tener partículas flexuosas, no envueltas, en forma de varilla que miden de 680 a 900 nm de largo y entre 11 a 15 nm de ancho (Figura 1). La mayoría de virus de esta familia pertenece a este género (Shukla *et al.*, 1994).

El genoma de TEV está constituido por una cadena simple de RNA de polaridad positiva de cerca de 9.4 kb de longitud, que contiene una única pauta de lectura abierta (ORF) que codifica una poliproteína, la cual se auto procesa dando lugar a 10 proteínas maduras (Figura 2) (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001).

**Figura 1.** Clasificación taxonómica del *Virus del grabado del tabaco* (TEV).



Clase: ssRNA (+)  
Familia: *Potyviridae*  
Género: *Potyvirus*

**Figura 2.** Organización del genoma de TEV.

Los extremos 5' y 3' están definidos por la presencia de la VPg y Poli(A) respectivamente. La poliproteína está formada por las diferentes proteínas virales que se indican. Las posiciones donde ocurre el corte proteolítico están indicadas por las flechas verticales. Las correspondientes proteasas virales están indicadas en la parte superior, con indicación precisa de la posición en las cuales cortan. La N- y C-terminal de NIa corresponden a los dominios VPg y proteasa, respectivamente.

Las características de las proteínas virales que conforman la poliproteína de los *Potyvirus* han sido ampliamente estudiadas, aportándonos información valiosa acerca del funcionamiento a nivel genómico (interacción entre proteínas), interacciones con los vectores (transmisión por áfidos) y comportamiento en la planta (síntomas). En la Tabla 1, se muestran las diferentes propiedades de cada una de estas proteínas.









**Tabla 1.** Descripción de las características de las proteínas virales que codifican el genoma de TEV.

Proteínas	Características	<i>Potyvirus</i> de referencia	Referencias
<b>P1</b>	Serín-proteasa con motivos característicos de tripsina. Proteasa que se auto-corta en C-terminal. Relacionada con la sintomatología.	TEV	Verchot y Carrington 1995; Urcuqui-Inchima <i>et al.</i> , 2001; Adams <i>et al.</i> , 2005
<b>HC-Pro</b>	Cisteín-proteasa con motivos característicos de papaína. Auto corte en C-terminal. Supresión del silenciamiento. Participa en la replicación, movimiento sistémico y transmisión mediada por áfidos.	TEV TVMV PVY	Wang <i>et al.</i> , 1996; Carrington <i>et al.</i> , 2001; Urcuqui-Inchima <i>et al.</i> , 2001; Adams <i>et al.</i> , 2005; Torres-Barceló <i>et al.</i> , 2008
<b>P3</b>	Movimiento sistémico y patogenicidad.	TEV WSMV TuMV	Urcuqui-Inchima <i>et al.</i> , 2001; Suehiro <i>et al.</i> , 2004; Choi <i>et al.</i> , 2005
<b>6K1</b>	Patogenicidad.	TEV	Urcuqui-Inchima <i>et al.</i> , 2001
<b>CI</b>	Actividad ATPasa/RNA helicasa. Movimiento célula a célula y sistémico, ensamblaje del virus y transmisión por áfidos.	TEV	Carrington <i>et al.</i> , 1998; Urcuqui-Inchima <i>et al.</i> , 2001
<b>6K2</b>	Anclaje del complejo de replicación viral a membrana.	TEV	Urcuqui-Inchima <i>et al.</i> , 2001
<b>NIa</b>	Serín proteasa con motivos característicos de tripsina. Interacción proteína-proteína. <u>NIa-Pro</u> : procesamiento de la poliproteína para producir productos funcionales. <u>NIa-VPg</u> : replicación y especificidad del huésped.	TEV	Carrington <i>et al.</i> , 1993; Daròs y Carrington 1997; Urcuqui-Inchima <i>et al.</i> , 2001; Charron <i>et al.</i> , 2008
<b>Nib</b>	RNA polimerasa RNA dependiente (RdRp). Replicación del genoma. Interacción con NIa.	TEV	Li <i>et al.</i> , 1997; Daròs <i>et al.</i> , 1999; Urcuqui-Inchima <i>et al.</i> , 2001
<b>CP</b>	Transmisión mediada por áfidos. Movimiento célula a célula y sistémico y ensamblaje viral.	TVMV PVC TEV	Mahajan <i>et al.</i> , 1996; Blanc <i>et al.</i> , 1997, 1998; Urcuqui-Inchima <i>et al.</i> , 2001



Los *Potyvirus* infectan una amplia gama de plantas de diversas regiones climáticas, en las que provocan pérdidas significativas en la calidad y una reducción de la producción en cultivos hortícolas, ornamentales y pastos. En la Tabla 2 encontramos información taxonómica detallada del conjunto de plantas huésped usadas en esta tesis (*Nicotiana tabacum*, *Capsicum annuum*, *Arabidopsis thaliana* y *Chenopodium quinoa*), además de la clase de síntomas que presenta la planta tras la infección por TEV.

**Tabla 2.** Clasificación taxonómica de los diferentes huéspedes empleados en esta tesis y síntomas producidos por TEV.

Huéspedes		Sintomatología	
Nicotiana tabacum var Xhanti			
	División : Magnoliophyta Clase: Magnoliopsida Orden: Solanales Familia: Solanaceae Género: Nicotiana		Grabado, moteado, clorosis, reducción del crecimiento vegetativo y necrosis.
Capsicum annuum var Marconi			
	División : Magnoliophyta Clase: Magnoliopsida Orden: Solanales Familia: Solanaceae Género: Capsicum		Grabado, clorosis y reducción del crecimiento vegetativo.
Arabidopsis thaliana			
	División : Magnoliophyta Clase: Magnoliopsida Orden: Capparale Familia Brassicaceae Género: Arabidopsis		Síntomas leves o asintomático, clorosis y reducción del crecimiento vegetativo.
Chenopodium quinoa			
	División : Magnoliophyta Clase: Magnoliopsida Orden: Caryophyllales Familia: Amaranthaceae Género: Chenopodium		Lesiones locales, cloróticas y necróticas.

## 1.2. El sustrato sobre el que actuará la selección natural: la variación genética

El objetivo de la genética de poblaciones es la comprensión de las principales fuerzas del cambio evolutivo y de como la eficacia biológica de los organismos cambia a medida que estos se adaptan a su ambiente. La eficacia biológica se define como la capacidad reproductiva de

un individuo relativa a otros en un ambiente definido. Cada cambio de ambiente impone diferentes requisitos a un virus, por lo que su eficacia nunca será un valor absoluto sino dependiente del ambiente en el que se evalúe. Esto es especialmente importante para virus de plantas que tengan una amplia gama de huéspedes o que pueden usar diferentes vectores para su transmisión.

Dos son los mecanismos que generan y mantienen la elevada variabilidad genética de los virus: la recombinación y la mutación.

#### 1.2.1. *Recombinación*

La recombinación es el proceso por el cual segmentos de información genética son intercambiados entre hebras de DNA de diferentes variantes genéticas durante el proceso de replicación. El intercambio genético tiene dos consecuencias: (1) Se exploran nuevas combinaciones de regiones genómicas de distinto origen (por ejemplo, el *Virus de la encefalitis equina del Oeste* (WEEV) parece ser el resultado de la recombinación entre un virus del tipo Sindbis y una cepa del *Virus de la encefalitis equina del Este* (EEEV). (2) Se recuperan genomas virales viables a partir de genomas parentales debilitados (Hahn *et al.*, 1988).

Recientemente, se ha publicado un estudio biogeográfico de 25 bacteriófagos de la familia *Cystoviridae*, en el que se analizó la recombinación intra y entre-segmentos y se encontró que presentan una alta tasa de recombinación entre segmentos con más del 50% de divergencia nucleotídica. Esta alta tasa de intercambio genético no tiene precedente en ningún otro taxón biológico (Silander *et al.*, 2005). Contrario a eso, en virus de plantas se ha reportado una baja frecuencia de recombinación, como es el caso del *Virus del mosaico del pepino* (CMV), en estudios de mezclas de infecciones en la misma plantas con subgrupos de la misma cepa (Escriu *et al.*, 2007; Pierrugues *et al.*, 2007) o con un virus de su misma familia (de Wispelaere *et al.*, 2005), siendo la recombinación una fuente de variabilidad para los virus en mayor o menor medida.

#### 1.2.2. *Mutación*

La replicación de los ácidos nucleicos no es completamente fiel y ocasionalmente se incorpora un nucleótido incorrecto en la síntesis de la cadena naciente. Si este error no es corregido, se le llama mutación. La mayoría de los efectos de las mutaciones son deletéreos pero son necesarios para obtener la diversidad que permite a los virus adaptarse a cambios en el ambiente (Manrubia *et al.*, 2006). Los virus de RNA necesitan del concurso de RNA

polimerasas dependientes de RNA o, en el caso de los retrovirus, de DNA replicasas dependientes de RNA. En ambos casos, estas polimerasas están codificadas en el genoma viral. Ambos tipos de enzimas tienen baja capacidad correctora de errores, lo que provoca una alta tasa de error durante la replicación. La tasa de mutación es un factor clave en la variabilidad de los virus: se ha comprobado que los ribovirus y retrovirus tienen tasas órdenes de magnitud superiores que los organismos de DNA, lo que les permite la generación de una enorme variedad de genomas mutantes.

Los efectos más frecuentes de las mutaciones son deletéreos. Por ejemplo, como la disminución de la eficacia de la transmisión de un *Begomovirus* por su vector puede estar asociada con tan sólo tres mutaciones en la proteína de la cubierta (Höhnle *et al.*, 2001). Carrasco *et al.* (2007) han demostrado que la gran mayoría de mutaciones puntuales en el genoma de TEV son deletéreas. No obstante, el efecto de las mutaciones necesariamente ha de servir para aumentar las probabilidades de innovación beneficiosa en la naturaleza, como ilustran adecuadamente los mutantes de escape a la ribavirina del poliovirus, donde encontró que un simple cambio en la polimerasa aumentaba la fidelidad de la replicación del virus (Pfeiffer *et al.*, 2003).

Los virólogos comúnmente se refieren, en general inadecuadamente, a las poblaciones virales como *cuasiespecies*, adoptando el término acuñado por M. Eigen para su teoría de los primeros replicones moleculares (Eigen 1971). Así, la teoría de las cuasiespecies virales predice que un aislado viral no está constituido por una única secuencia, sino que existe una nube de secuencias mutantes alrededor de una más abundante llamada secuencia maestra y que la eficacia biológica del virus depende de la población de mutantes o cuasiespecie, ya que ésta es la unidad sobre la que actúa la selección. La aplicación de la teoría de las cuasiespecies a poblaciones virales ha sido ampliamente revisada (Domingo y Holland 1997), pero también discutida (Domingo 2002; Holmes y Moya 2002).

### **I.3. Las fuerzas del cambio evolutivo**

Las fuerzas del cambio evolutivo que determinan la distribución de variantes genéticas en las poblaciones de virus, ya sean generados por recombinación o mutación, son tres: la deriva genética, la selección natural y la migración.

### 1.3.1. *Deriva genética*

La deriva genética es el muestreo aleatorio de los genotipos y adquiere importancia cuando las poblaciones no son lo suficientemente grandes para garantizar que cada variante esté representada en la próxima generación en una frecuencia equivalente a la original (Freeman *et al.*, 2002). La causa más probable de la deriva genética en virus son los cuellos de botella asociados a la colonización de nuevos órganos dentro de un huésped, la transmisión entre huéspedes (especialmente cuando ésta es mediada por vectores), o el barrido selectivo asociado con la fijación de una variante beneficiosa.

En virus de plantas los cuellos de botella durante la infección de nuevos órganos se asocian al movimiento sistémico dentro del tejido vascular. Hall *et al.* (2001) analizaron la distribución espacial de dos cepas del *Virus del estriado de trigo* (WSMV) en plantas de trigo coinfectadas, encontrando una fuerte evidencia de diferenciación genética dentro de la hoja y los meristemos secundarios y concluyendo que los virus genéticamente similares no solían encontrarse compartiendo espacio en los mismos tejidos. Sin embargo, al coinocular WSMV y el *Virus del mosaico del bromo* (BMV) encontraron que la separación espacial de las poblaciones no ocurría con estos dos virus no relacionados (Hall *et al.*, 2001).

Por otra parte recientes trabajos cuantitativos han evaluado el impacto de los cuellos de botella durante la colonización viral en tejidos distales de las plantas. Por ejemplo, Li y Roossinck (2004) emplearon mezclas complejas de genotipos de CMV, de composición controlada, para inocular plantas de tabaco y monitorizaron a través del tiempo la infección sistémica y de las hojas inoculadas, concluyendo que el tamaño del cuello de botella asociado con el movimiento sistémico era aproximadamente la mitad de los genotipos inoculados. Los resultados de Sacristán *et al.* (2003) extendieron estas observaciones al caso del TMV, concluyéndose que el tamaño del cuello de botella era de dos órdenes de magnitud más pequeño que del tamaño de la población inoculada.

Ali *et al.* (2006) estudiaron los cuellos de botella asociados con la transmisión de CMV entre huéspedes mediada por vector. Para ello, generaron poblaciones polimórficas de CMV de composición conocida (12 genotipos distintos) que se emplearon para ser transmitidas por dos vectores, *Aphis gossypii* y *Myzus persicae*. Los autores demostraron que el vector más eficiente fue *A. gossypii* y que los áfidos podían adquirir múltiples virus sin preferencia. Finalmente concluyeron que la transmisión horizontal por áfidos constituye un cuello de botella significativo; recuperándose a partir de áfidos individuales, en promedio, 10 mutantes

de *A. gossypii* y 8 mutantes de *M. persicae*, de los 12 genotipos inoculados. Estos ejemplos indican que la evolución de las poblaciones virales dentro de la planta y entre plantas no puede explicarse exclusivamente por modelos deterministas y que los efectos aleatorios debidos a la deriva génica deben tomarse en cuenta.

Desde el principio de la década de los 90 del pasado siglo quedó bien establecido que los cuellos de botella en poblaciones virales conllevaban significativas pérdidas de eficacia como consecuencia de un fenómeno equivalente al trinquete de Müller (Chao 1990; Duarte *et al.*, 1992; de la Peña *et al.*, 2000). Brevemente, este fenómeno consiste en la pérdida aleatoria de la clase genotípica menos mutada, que en ausencia de recombinación o de reversiones, hace que la media de la distribución de mutaciones por genoma aumente paulatinamente (Müller 1964). Este efecto pernicioso sobre la eficacia viral ha sido recientemente comprobado también para el TEV (de la Iglesia y Elena 2007).

### 1.3.2. Selección

La selección positiva o direccional, es el proceso por el cual la frecuencia de nuevas variantes con mayor eficacia biológica que las anteriores, en un determinado ambiente incrementa su frecuencia en la población. Al proceso opuesto, por el cual nuevas variantes con menor eficacia biológica que los ya existentes, se mantienen a baja frecuencia se le denomina selección negativa o purificadora (Freeman *et al.*, 2002).

La selección natural es la única de las fuerzas evolutivas que produce adaptación a través de la propagación de mutaciones beneficiosas y el remplazo de unos genotipos por otros de mayor eficacia. Los virus de plantas presentan, en general, una alta variabilidad en su gama de huéspedes: algunos infectan sólo una o muy pocas especies afines (especialistas). En este caso la competición interespecífica limita el acceso de los recursos disponibles (Futuyma *et al.*, 1988). Por otra parte, otros virus pueden infectar a una amplia gama de huéspedes, incluso pertenecientes a diferentes grupos taxonómicos (generalistas). En este caso los virus generalistas deberían ser capaces de explotar múltiples huéspedes y aumentar su eficacia biológica en cada uno de ellos, aunque también pueden ver su eficacia mermada ciñéndose al adagio popular “aprendiz de mucho, maestro de nada” (Whithlock *et al.*, 1996). Un objetivo importante de la evolución experimental de virus ha sido investigar la dinámica de este proceso de adaptación a distintos huéspedes. Empleando un análisis comparativo de los síntomas inducidos por los miembros de diversas familias de virus de plantas, además de una estima cuantitativa de la susceptibilidad a la infección de distintas familias de plantas,

Agudelo-Romero y Elena (2008) han propuesto que los virus generalistas son, en promedio, menos virulentos. Por el contrario, los virus especialistas explotarían la planta, en promedio, de manera más virulenta.

Esto sugiere que la evolución debería favorecer a los especialistas, debido bien a que un compromiso adaptativo limita la eficacia en los generalistas o bien porque la evolución sucede más rápido en nichos restringidos (Futuyma *et al.*, 1988; Whithlock *et al.*, 1996). Existen dos teorías acerca de las causas de la especialización: (1) La pleiotropía antagonista ocurre cuando las mutaciones que son beneficiosas en un ambiente concreto resultan ser deletéreas en otros ambientes. Por ejemplo, la adaptación de un virus a las defensas de un huésped particular, a causa de una o varias mutaciones que son beneficiosas en el nuevo huésped, podría resultar contraproducente en el huésped original. Esto deriva en que la eficacia aumenta en el nuevo huésped y disminuye en original, lo que a su vez conduce a un mayor grado de especialización (Fry 1996). (2) Acumulación de mutaciones ya sea debido a la deriva genética o a barridos selectivos. Así, las mutaciones neutrales en el nuevo huésped serían deletéreas en el huésped original (Kawecki 1994). Sea cual fuere el mecanismo, cuando el virus se adapta a un nuevo huésped, su eficacia biológica se ve penalizada en el huésped original.

La evolución experimental de virus de RNA ha proporcionado una visión general de la evolución de la gama de huéspedes. Un ejemplo ilustrativo de este tipo de experimentos es el realizado por Turner y Elena (2000) con VSV, donde se mantuvo la evolución en diferentes tipos de líneas celulares por separado o alternando las líneas celulares al azar. Así las poblaciones virales evolucionadas en un tipo celular constante se convierten en especialistas, penalizando la eficacia biológica en cualquier huésped alternativo. Por el contrario, las poblaciones virales evolucionadas en ambientes fluctuantes se convierten en generalistas sin pagar necesariamente un coste de eficacia biológica en huéspedes alternativos. Al analizar los cambios en el genoma de estas poblaciones experimentales de VSV se observaron frecuentes convergencias y un enorme paralelismo entre las poblaciones evolucionadas en los diferentes tipos celulares (Remold *et al.*, 2008), lo que se interpretó como una consecuencia de las restricciones al cambio impuestas por el pequeño y altamente compacto genoma de este virus.

Uno de los ejemplos recientes más espectaculares de adaptación a un nuevo huésped es el del *Virus de la rotura de la flor de clavel* (PFBV) al adaptarse a *Chenopodium quinoa*. Cuando un aislado natural del PFBV se mantuvo en *C. quinoa* durante años, este fijó cinco sustituciones en aminoácidos no contiguos (llamado patrón VFYII) en la proteína de cubierta (CP). Este patrón nunca ha sido descrito en aislados naturales. Cuando un aislado del virus que contiene

el patrón silvestre en los aminoácidos relevantes (ASHMV), fue inoculado mecánicamente en hojas de *C. quinoa*, tan sólo fueron necesarios cuatro pases seriados para que todo el patrón específico VFYII se fijase en linajes independientes (Rico *et al.*, 2006). El hecho de que este patrón no se haya encontrado en el huésped natural, ni siquiera parcialmente, nos habla acerca de la fuerte limitación que puede imponer sobre la eficacia biológica de PFBV su huésped natural.

La literatura contiene un buen número de ejemplo de plantas cuya resistencia transgénica ha sido rota por el virus para el que se había desarrollado, y que son útiles para ilustrar el coste de la ampliación de la gama de huéspedes. Un ejemplo interesante en este sentido es el de la rotura de la resistencia transgénica en nabos por parte del *Virus del mosaico del nabo* (TuMV) (Jenner *et al.*, 2002). Estos autores caracterizaron tres genomas virales generalistas capaces de infectar tanto nabos silvestres como transgénicos. Cuando estos virus generalistas se compitieron en nabos silvestres contra el virus silvestre, éste último siempre mostró mayor eficacia en estas plantas.

#### **I.4 La evolución de la virulencia**

La virulencia se define como el efecto negativo del virus sobre la eficacia biológica o viabilidad de la planta. La expresión de la virulencia es el resultado de la acción combinada de factores virales y factores del huésped.

Como cualquier otro carácter variable con base genética, la virulencia puede evolucionar por acción de la selección natural. Así, se han propuesto infinidad de modelos para explicar cómo ha de evolucionar la virulencia de un parásito. Por ejemplo, en respuesta a distintos tipos de transmisión (Lipsitch *et al.*, 1996). Si la transmisión del parásito es fundamentalmente vertical (de padres a hijos), se espera una reducción de la virulencia, ya que la eficacia biológica del patógeno está estrechamente relacionada al éxito reproductivo del huésped (Lipsitch *et al.*, 1996). Por el contrario, si la transmisión es principalmente horizontal entre huéspedes, la selección favorecerá a los patógenos que tengan mayor transmisibilidad aún a costa de ser más virulentos (Lipsitch *et al.*, 1996). Ejemplos de ambos tipos se pueden encontrar en virus de plantas. Por ejemplo, en el estudio de Escribe *et al.* (2000) llevado a cabo durante una epidemia de CMV en tomates, se mostró que existía un compromiso entre la virulencia y la tasa de transmisión horizontal.

Haciendo uso de la evolución experimental para comprobar el efecto del tipo de transmisión sobre la virulencia, Stewart *et al.* (2005) evolucionaron el *Virus del mosaico rayado de la cebada* (BSMV) bajo dos tratamientos experimentales distintos. En uno se simulaba un



proceso de transmisión horizontal y en otro uno de transmisión vertical. Se observó, por una parte, que el BSMV evolucionado bajo el protocolo de transmisión horizontal respondió con altas tasas de patogenicidad y aumentó su virulencia. Por otro lado, BSMV evolucionado mediante transmisión vertical exhibió altas tasas de transmisión por semillas y también baja virulencia. Los cambios observados en la virulencia de BSMV no estaban correlacionados con los cambios en la acumulación del virus dentro del huésped, sugiriendo que la virulencia no es una consecuencia directa de la replicación y acumulación viral sino que puede estar mediada por una serie de respuestas complejas por parte de la planta.

### **I.5. Interacciones patógeno-huésped: respuestas de defensa de la planta**

Las plantas están expuestas continuamente al ataque de diversos patógenos, de los que como organismos sésiles que son no pueden escapar, pero sí poseen avanzadas estrategias de defensa que incluyen tanto defensas innatas como inducibles (Heath *et al.*, 2000). Las defensas inducibles involucran a una red compleja de percepción, amplificación y traducción de señales que incluye el reconocimiento de la invasión del patógeno mediante una señal inicial, cascadas de fosforilación de proteínas, flujo de iones, generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y generación de señales secundarias (rutas del ácido salicílico, del ácido jasmónico y del etileno).

Los procesos que se ven afectados en la planta durante la infección del patógeno van desde la división y diferenciación celular y el desarrollo tisular, pasando por la absorción del agua y minerales del suelo y su transporte al resto de la planta, la fotosíntesis o el almacenamiento de reservas alimenticias, hasta la reproducción, pero siempre causando un deterioro en el vigor y productividad de la planta. Por esto, es de gran importancia estudiar las interacciones patógeno-huésped para desarrollar nuevas estrategias que permitan controlar los patógenos vegetales (virus, hongos, bacterias, nemátodos) que causan un impacto negativo en la agricultura.

La percepción del ataque de un patógeno viene mediada por moléculas derivadas de éste, llamadas elicitores. La respuesta a esta señalización se realiza de acuerdo al tipo de elicitador que reconozca la planta. Se desencadenan una serie de respuestas iniciales como la fosforilación de proteínas de membrana plasmática, el incremento de la concentración de calcio citoplásmico, cambios rápidos en el flujo de iones, activación de proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK) y de oxidasas dependientes de NADPH, o la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Zhao *et al.*, 2005). Una cadena de señales de alarma se transmite intracelularmente y comienza la acumulación de fitoalexinas y la producción de



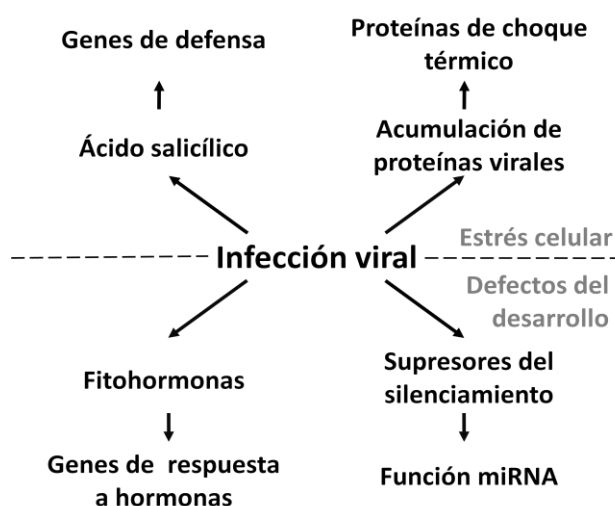
proteínas relacionadas con patogénesis (PR), siendo ésta una respuesta general de las defensas de las plantas independiente del tipo de elicitor que se detecte (Zhao *et al.*, 2005). Los elicitores específicos inducen el sistema de resistencia contra la enfermedad basado en el modelo *gen a gen*. En éste, el patógeno sintetiza proteínas de avirulencia (Avr) que corresponden a alguna proteína de resistencia (R) sintetizada por la planta. Cuando existe una defensa específica denominada respuesta hipersensible (HR), se produce la muerte de las células infectadas y la enfermedad no prospera (interacción incompatible).

El reconocimiento del patógeno en la etapa inicial de la infección dispara la producción de reguladores del crecimiento endógenos de señalización, como los ácidos salicílico (SA) y jasmonico (JA) y el etileno (ET). Estos operan sobre las dos principales rutas de defensa en plantas conocidas, una dependiente de SA y otra dependiente de JA y ET (Rojo *et al.*, 2003). El SA interviene en la activación de la respuesta sistémica adquirida (SAR). La SAR está asociada con la acumulación de componentes de defensa de la planta, tales como las proteínas relacionadas con la patogenicidad (PR), y es efectiva contra una amplia gama de patógenos. En una interacción incompatible desarrollada por una planta resistente, se desencadenan la resistencia gen por gen que conlleva una HR, y finalmente SAR (Glazebrook *et al.*, 2005). El papel del ácido abscísico (ABA) y las auxinas en la señalización del estrés abiótico también ha sido ampliamente estudiado. Por ejemplo, el ABA regula negativamente la ruta del SA relacionada con la resistencia basal (Rojo *et al.*, 2003). Por otra parte, tratamientos exógenos con ABA incrementan la susceptibilidad en la respuesta de varias especies de plantas a la infección de patógenos como hongos y bacterias (Torres-Zabala *et al.*, 2007).

Algunos genes relacionados con la defensa de las plantas han sido aislados y caracterizados. Entre ellos se encuentran proteínas receptoras de quinasas, MAPK, transportadores de iones, factores de transcripción (TF), componentes oxidativos dependientes del NADPH, proteínas PR y fitoalexinas (Xiong *et al.*, 2001). Una aproximación alternativa que permite la identificación masiva de genes relacionados con la defensa de la planta a patógenos consiste en el uso de micromatrices de oligos de DNA en experimentos tratamiento-control en los que se puede deducir qué genes son expresados diferencialmente durante la infección viral (Itaya *et al.*, 2002; Golem y Culver 2003; Whitham *et al.*, 2003; Marathe *et al.*, 2004; Senthil *et al.*, 2005; Pompe-Novak *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2007; Ascencio-Ibáñez *et al.*, 2008). La infección viral produce cambios en el transcriptoma de la planta e identificar qué genes muestran un perfil de expresión génica alterado permitirá descifrar cómo y porqué son iniciados. El principal objetivo de esta aproximación es usar esta información para investigar las funciones de los genes alterados durante la infección viral.

Whitham *et al.* (2006) propusieron la hipótesis de que diferentes grupos de genes coregulados eran manipulados para crear un ambiente favorable a la infección, afectando a los mecanismos de defensa y estrés, alterando el desarrollo de la planta e induciendo la aparición de síntomas (Fig. 3).

**Figura 3.** Respuestas del huésped y alteración de los patrones de expresión génica asociada a la infección viral en plantas.



Interacción compatible entre huéspedes susceptibles y patógenos virulentos, que frecuentemente permiten la expresión de genes que conducen a la defensa y genes de choque térmico. La expresión de estos genes es controlada por las rutas de señalización asociadas a la iniciación de respuestas de defensa de la planta y por otras respuestas a estrés celular. La infección viral puede romper las funciones de regulación de pequeños RNAs, como micro RNAs, y señales de fitohormonas o biosíntesis que conducen a defectos en el desarrollo (Whitham *et al.*, 2006).

## I.6. Estudios de expresión génica

La planta modelo *A. thaliana* cuenta con múltiples ventajas a la hora de investigar las interacciones virus-huésped. Así, por ejemplo, posee un pequeño tamaño, un corto ciclo de vida, una gran producción de semillas y fácil propagación. A nivel genotípico, por ejemplo, tiene un genoma relativamente pequeño y numerosa información disponible y un gran banco de germoplasma. Estas características la han convertido en un modelo excelente para el estudio de genes implicados en el desarrollo, rutas metabólicas, respuestas a señales del ambiente (bióticas y abióticas) y resistencia a enfermedades. Además, esta planta se encuentra entre los organismos cuyos genomas han sido ya completamente secuenciados, con lo que se ha iniciado una fase de estudios funcionales de todos los genes identificados.

El uso de las micromatrices de DNA permite analizar la expresión génica monitorizando simultáneamente la expresión de cientos de genes. Este abordaje al análisis de la expresión génica global permite acelerar las investigaciones dirigidas a la anotación de genes y la búsqueda de sus funciones para predecir con precisión las relaciones genotipo-fenotipo, lo que

representa un objetivo de gran importancia en la genómica funcional. Anteriormente, la identificación y caracterización de genes que regulan respuestas a tratamientos específicos se había hecho individualmente o en pequeños grupos. En la actualidad, la tecnología de las micromatrices permite el análisis simultáneo de un gran número de genes en respuesta a condiciones específicas. La aplicación de las micromatrices tiene un rango de utilidad muy variado que va desde el genotipado (Ross *et al.*, 2008) hasta el análisis de pacientes con ciertos tipos de cánceres (Alon *et al.*, 1999).

Las micromatrices se han aplicado a plantas para investigar los cambios en las respuestas transcripcionales que se producen como respuesta a diferentes tratamientos: deficiencias nutricionales (Pernas *et al.*, 2007), estreses abióticos tales como calor, frío, salinidad, sequía, alta osmolaridad, luz ultravioleta y heridas (Kilian *et al.*, 2007), o estreses bióticos inducidos por bacterias (Torres-Zabala *et al.*, 2007), hongos (Ton y Mauch-Mani 2004), insectos (Kempema *et al.*, 2007), virus (Whitham *et al.*, 2003) y viroides (Itaya *et al.*, 2002).

Como parásitos intracelulares obligatorios que son, los virus inducen una variedad de respuestas en las células por la perturbación y manipulación de diferentes vías de señalización. Por lo tanto, una consecuencia de la infección viral es la alteración de la expresión génica del huésped. El desafío será pues identificar qué genes presentan alteraciones transcripcionales durante la interacción virus-planta en un ambiente favorable para la infección. En plantas, las estrategias desplegadas por los virus están bien documentadas: la formación de complejos de replicación, la supresión del silenciamiento génico post-transcripcional, la alteración del tráfico célula a célula, y la interferencia con la regulación del ciclo celular de las plantas (Whitham *et al.*, 2003). A su vez, las plantas pueden combatir la infección viral si poseen genes o mecanismos generales de resistencia eficaces contra el virus invasor tales como la activación de la SAR.

Los trabajos enumerados en la Tabla 3 ilustran la diversidad de técnicas utilizadas para estudiar perfiles de expresión asociados a infección por virus. Whitham *et al.* (2006) clasificaron estos trabajos en cinco clases experimentales:

(i) *Perfil de respuestas del huésped a la infección por distintos genotipos virales.* El perfil de expresión de las plantas infectadas por virus silvestre proporciona la línea base con la que comparar el perfil de respuesta en plantas infectadas con distintos mutantes virales. Estos experimentos proporcionan una visión general sobre las funciones de las proteínas virales.

(ii) *Análisis comparado de la respuesta del huésped a diferentes virus, patógenos y estrés abiótico.* Esta aproximación sirve para identificar respuestas comunes o específicas a la

infección viral. Esta aproximación también puede utilizarse para comparar datos de expresión generados por infección viral con otros obtenidos para otros patógenos o para diferentes estreses abióticos.

**Tabla 3.** Selección de trabajos que emplean diferentes metodologías para el estudio de la expresión génica en respuestas a la infección viral (Whitham *et al.*, 2006).

Huésped	Virus <sup>a</sup>	Enfoque del estudio	Tejido	Aproximación	Referencia
<b>Hibridación <i>in situ</i></b>					
Guisante	PSbMV	Genes sub-regulados	Embrionario	5	Wang y Maule 1995
Guisante	PSbMV	HSP70/ubiquetina	Embrionario	5	Aranda <i>et al.</i> , 1996
Guisante	PSbMV, PEBV, WCIMV, BCTV	HSP70/Liposigenasa	Embrionario	5	Escaler <i>et al.</i> , 2000
Calabaza	CMV	HSP70/NADP-ME	Cotiledones	5	Havelda y Maule 2000
<b>Exposición diferencial</b>					
Arabidopsis	CaMV, CaMV gen VI	Perfil global	Hojas sistémica	1, 4	Geri <i>et al.</i> , 1999
Quenopodio	TMV	Perfil global	Hojas inoculadas	2	Cooper 2001
<b>Análisis de expresión génica (SAGE)</b>					
Yuca	ACMV	Perfil global	Tejido mixto	1	Fregene <i>et al.</i> , 2004
<b>Macromatrices</b>					
Tomate	PSTVd, TMV	Perfil global	Hojas sistémicas	1, 2	Itaya <i>et al.</i> , 2002
Arabidopsis	CMV	Perfil global	Hojas inoculadas	1	Ishihara <i>et al.</i> , 2004
<b>Micromatrices</b>					
Arabidopsis	CMV, CaMV, ORMV, PVX, TVCV, TuMV	Factores de Transcripción	Hojas inoculadas	1, 2	Chen <i>et al.</i> , 2002
Arabidopsis	CMV, ORMV, PVX	Perfil global	Hojas inoculadas	1, 2	Whitham <i>et al.</i> , 2003
Arabidopsis	TMV	Perfil global	Hojas sistémicas	1	Golem y Culver 2003
Arabidopsis	CMV	Perfil global	Hojas inoculadas	1	Marathe <i>et al.</i> , 2004
Arabidopsis	CMV, ORMV	388 genes pre-seleccionados	Hojas inoculadas	2, 3	Huang <i>et al.</i> , 2005
<i>N. benthamiana</i>	INSV, SYNIV	Perfil global	Hojas sistémicas	1, 2	Sethil <i>et al.</i> , 2005
Arabidopsis	Proteína AC2 de MYMV	Perfil global	Protoplastos	4	Trinks <i>et al.</i> , 2005
<b>Proteómica</b>					
Arroz	RYMV	Perfil global	Células en suspensión	1, 3	Ventelon-Debout <i>et al.</i> , 2004

<sup>a</sup> El Virus del mosaico del guisante transmitido por semilla (PSbMV), el Virus del oscurecimiento precoz del guisante (PEBV), el Virus del mosaico del trébol blanco (WCIMV), el Virus del encrespamiento de la remolacha (BCTV), el Virus del mosaico del pepino (CMV), el Virus del mosaico de la coliflor (CaMV), el Virus del mosaico del tabaco (TMV), el Virus africano del mosaico de la yuca (ACMV), el Viroide del tubérculo fusiforme de la patata (PSTVd), el Virus del mosaico de la colza (ORMV), el Virus X de la patata (PVX), el Virus de clareado de las nervaduras del nabo (TVCV), el Virus del mosaico del nabo (TuMV), el Virus de la mancha necrótica de *Impatiens* (INSV), el Virus del reticulado amarillo del sonchus (SYNV), el Virus del mosaico amarillo del frijol mungo (MYMV) y el Virus del moteado amarillo del arroz (RYMV).

<sup>b</sup> Aproximaciones experimentales que consisten en: **1.** Perfil de respuestas del huésped frente a virus genotipo silvestre o mutantes. **2.** Análisis comparativo de las respuestas del huésped a diferentes virus, patógenos, respuestas a estrés abiótico. **3.** Huéspedes o genotipos mutantes. **4.** Expresión de proteínas individuales de virus y ácidos nucleicos. **5.** Relación espacio temporal entre la infección viral y las respuestas del huésped.

(iii) *Diferentes genotipos de la planta.* Del análisis de diferentes genotipos de una planta se puede comprender cómo se controla la respuesta a la infección y si éstos tienen diferentes efectos sobre la patogenicidad viral.

(iv) *Expresión de proteínas y ácidos nucleicos de virus individuales.* El objetivo es expresar componentes individuales de un virus de manera constitutiva o bajo el control de promotores inducibles para estudiar su efecto sobre la expresión de genes del huésped. La expresión de proteínas virales, solas o combinadas, ayudará a asignar respuestas de genes coregulados a una o varias proteínas virales.

(v) *Relaciones espacio-temporales entre la infección viral y las respuestas del huésped.* Los ensayos de expresión génica realizados sobre muestras de hojas completas u otros tejidos, aunque prácticos, no proporcionan una representación fidedigna de los cambios que la infección induce en los perfiles de transcripción.

Son diversos los estudios sobre alteraciones de perfiles de expresión génica en plantas infectadas por virus. Por ejemplo, se ha estudiado el patosistema *A. thaliana* ecotipo Shahdara (huésped susceptible) infectada con TMV. Este virus presenta movimiento sistémico e induce síntomas tales como enanismo, necrosis y hojas curvadas. La expresión génica se monitorizó en hojas completas a dos tiempos post-inoculación. Mientras que a los 4 dpi no se vio afectado el transcriptoma de *A. thaliana*, a los 14 dpi el número de genes cuya expresión estaba alterada aumentó notablemente. Se ha sugerido que este efecto podría deberse a que las respuestas específicas del virus se localizan en los tejidos nuevos. La infección sistémica de TMV altera genes pertenecientes a categorías funcionales tales como factores de transcripción, proteínas relacionadas con el estrés, o que participan en el metabolismo (Golem y Culver 2003).

En un trabajo más ambicioso realizado por Whitham *et al.* (2003) se analizaron y compararon las alteraciones en el transcriptoma de *A. thaliana* ecotipo Col-0 inducidas por cinco virus con diferentes características en su ciclo de vida (encapsidación, replicación y movimiento) y asignaciones taxonómicas. Estos virus son el CMV, el *Virus del mosaico de la colza* (ORMV), el *Virus del clareado de las venas del nabo* (TVCV), el *Virus X de la patata* (PVX) y el TuMV. El empleo de diversos virus permitió estudiar qué cambios de expresión génica correspondían con respuestas generales a la infección y cuáles eran específicos de cada virus. En general, 114 genes únicos se indujeron en respuesta a la infección con cada uno de los cinco virus, lo que constituiría el conjunto de genes de respuesta general a la infección viral o representaría un mecanismo común utilizado por los virus para favorecer su propia replicación y movimiento. Aproximadamente la tercera parte de estos genes (35/114) están asociados con rescate, defensa ante patógenos, apoptosis y senescencia. Además, se sobreexpresaron siete genes involucrados en la regulación del estrés oxidativo y seis genes de proteínas del choque térmico (HSP) o afines a choque térmico (HSC).

Por otra parte, Marathe *et al.* (2004) estudiaron la respuesta inmunitaria innata de la planta mediada por los genes de resistencia (*R*), en la que se incluye la respuesta hipersensible (HR) por muerte celular. Para esto analizaron el perfil de transcripción de *A. thaliana* transgénicas para el gen de resistencia *RCY1* a la cepa Y del CMV. Identificaron 444 genes diferencialmente expresados. Estos genes pertenecían a nueve clases funcionales, siendo la

más abundante la de genes anotados como de función desconocida. Otras clases funcionales sobrerrepresentadas incluyeron las quinasas y fosfatasa, la maquinaria de degradación de proteínas/proteasas, reguladores transcripcionales y otras. Al analizar la región promotora de estos 444 genes se concluyó que 80 de ellos podrían estar activados por los genes *R* de defensa contra patógenos como virus y bacterias.

Otro estudio minucioso fue llevado a cabo por Yang *et al.* (2007), quienes abordaron la alteración de los patrones de expresión génica de huésped desde el punto de vista de la relación espacio-temporal de las respuestas tras la infección viral. Para esto utilizaron un clon de TuMV etiquetado con la proteína fluorescente verde, lo que les permitió la disección de los focos de infección en cuatro zonas distintas a medida que estos se expandían. Los niveles de transcripción de distintos mRNAs se vieron alterados de manera significativa a lo largo del gradiente de la acumulación de virus desde las células centrales al foco hacia el exterior. Los genes de respuesta a TuMV estuvieron sobre o infrarregulados en respuesta a la acumulación de virus. Este análisis espacial permitió identificar genes asociados a las funciones del cloroplasto, asimilación de sulfatos y extensibilidad de la pared celular coherente con los síntomas virales (clorosis y retraso en el crecimiento).

## OBJETIVOS

---





## OBJETIVOS

**E**n este trabajo perseguimos analizar el coste pleiotrópico de la ampliación de la gama de huéspedes del *Virus de grabado del tabaco* (TEV), estudiando las dinámicas adaptativas del virus partiendo de un clon ancestral y su posterior evolución en huéspedes heterólogos, lo que nos permitirá un abordaje evolutivo a niveles fenotípico y genotípico. En concreto se abordarán los siguientes objetivos específicos:

1. Explorar el coste de la ampliación de la gama de huéspedes de TEV dentro de la misma familia de plantas *Solanaceae* (*Nicotiana tabacum* var. Xhanti y *Capsicum annuum* var. Marconi). Estudiar las tasas de evolución observadas.
2. Analizar la adaptación a un huésped perteneciente a un taxón diferente, *Arabidopsis thaliana* ecotipo Ler-0 (familia *Brassicaceae*). Se abordarán cuatro cuestiones distintas pero relacionadas:
  - Conocer cómo está afectado el patrón global de expresión génica de *A. thaliana* tras la infección con TEV.
  - Simular un proceso de emergencia de un virus de plantas, que cruza la barrera de las especies desde su huésped natural a uno parcialmente susceptible (*A. thaliana* Ler-0). Estudiar los cambios evolutivos experimentados por el virus (fenotípicos y genotípicos).
  - Explorar si la adaptación de TEV a *A. thaliana* modifica el patrón de expresión génica global anteriormente descrito. Este experimento permitirá definir cuáles son las dianas del transcriptoma de la planta a las que el virus se adapta.
  - Evaluar la patogenicidad del TEV ancestral y adaptado a *A. thaliana* Ler-0 en nueve ecotipos distintos provenientes de diferentes zonas del planeta, con el fin de determinar si la adaptación a un ecotipo dado, habilita al virus a explotar otros distintos.



## PARTE I

---

Capítulo 1. Coste pleiotrópico de la especialización a un huésped por del *Virus de grabado del tabaco*.





# The pleiotropic cost of host-specialization in *Tobacco etch potyvirus*

Patricia Agudelo-Romero<sup>a</sup>, Francisca de la Iglesia<sup>a</sup>, Santiago F. Elena<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-UPV, València, Spain

<sup>b</sup> The Santa Fe Institute, Santa Fe, NM, USA

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 26 February 2008

Received in revised form 27 July 2008

Accepted 30 July 2008

Available online 14 August 2008

### Keywords:

Adaptation

Experimental evolution

Evolution of virulence

Plant virus

Specialization

Tradeoffs

Virus evolution

## ABSTRACT

Host-range expansion is thought to allow viruses to broaden their ecological niches by allowing access to new resources. However, traits governing the infection of multiple hosts may decrease fitness in the original one due to the pleiotropic effect of adaptive mutations that may give rise to fitness tradeoffs across hosts. Here, we have experimentally examined the consequences of host-specialization in the plant pathogen *Tobacco etch potyvirus* (TEV). Replicate populations of TEV were allowed to evolve for 15 serial undiluted passages on the original tobacco host or on pepper, a novel host. Virulence and biologically active viral load were evaluated during the course of the experiment for each lineage on both potential hosts. In agreement with the tradeoff hypothesis, lineages evolved in the novel host experienced substantial increases in virulence and virus accumulation in its own host, but suffered reduced virulence and accumulation on the original host. By contrast, lineages evolved on the ancestral host did not increase virulence or viral load on either host. Genomic consensus sequences were obtained for each lineage at the end time point. The potential relevance for the evolution of virulence and virus fitness of the characterized mutations is discussed.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Hosts comprise the main environmental factor affecting the evolution of parasites (Ehrlich and Raven, 1964; Thompson, 1994; Combes, 2001). The degree to which parasites adapt to a particular host depends on the balance between within-host selection and among-host gene flow (Gandon et al., 1996; Kaltz and Shykoff, 1998; Lajeunesse and Forbes, 2001; Dennehy et al., 2006). Host specialization represents the reduction in the number of potential host species on which a parasite can successfully survive and reproduce. Such specialization implies that specialist parasites are better adapted to their main host than to alternative ones. By contrast, generalist parasites will have access to a much larger number of hosts, providing them with an advantage. Furthermore, host heterogeneity has been suggested as a main force maintaining parasites diversity (Maclean, 2005), whereas host homogeneity promotes the evolution of specialist genotypes, reduces genetic variability for fitness, and limits gene flow among parasite populations, thereby enhancing local adaptation and speciation (Thompson, 1994; Woolhouse et al., 2001). However, generalist

parasites are not the norm, but rather an exception, suggesting that generalism may have some disadvantages that have not yet been clearly defined. Theories assume a cost of generalism, in keeping with the adage that a “jack-of-all-trades” is a master of none (Whitlock, 1996) and hypotheses have been brought forward to explain why generalists are rare. It has been suggested that evolution should favor specialists because there are tradeoffs that limit the fitness of generalists in any of the alternative hosts or because evolution proceeds faster with narrower niches (Whitlock, 1996; Woolhouse et al., 2001). In principle, several mechanisms can generate these tradeoffs. The simplest mechanism is antagonistic pleiotropy, in which mutations that are beneficial in one host might be deleterious in an alternative one (Fry, 1996). Antagonistic pleiotropy could limit the range of adaptation and promote the evolution of specialization (Duffy et al., 2006). A second mechanism that promotes the existence of tradeoffs is mutation accumulation, in which mutations accumulate by drift in genes that are useless in one host but useful in another (Kawecki, 1994).

Plants are not passive victims of their parasites, but coevolve with them to provide efficient defenses (e.g., gene silencing, systemic acquired resistance, or hypersensitive local responses) that limit, reduce or eliminate the damage caused by parasites (Ehrlich and Raven, 1964; Woolhouse et al., 2001, 2002). The role of the host defenses in parasite specialization remains largely undetermined. Rather than being an exception, plant viruses commonly infect

\* Corresponding author at: Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-UPV, CPI 8E, C/Ingeniero Fausto Elio s/n, 46022 València, Spain. Tel.: +34 963 877 895; fax: +34 963 877 859.

E-mail address: [sfelena@ibmcp.upv.es](mailto:sfelena@ibmcp.upv.es) (S.F. Elena).

multiple host species, in many cases the host species belong to different, even unrelated, plant families. However, it has been recently shown that generalist plant viruses do not distribute randomly across all their potential hosts, but tend to associate preferentially with a particular one (Malpica et al., 2006). Since the machinery required for infection, exploitation, and transmission likely varies among plant hosts, the selective pressures acting over a plant virus on different hosts may vary as well.

Here we took an experimental evolution approach to determine the cost of host-specialization in the plant virus *Tobacco etch potyvirus* (TEV). The TEV genome is composed of a 9.5 kb positive polarity single-stranded RNA that encodes a large ORF whose translation generates a polyprotein that is subsequently self-processed by virus-encoded proteases into 10 mature peptides (Urcuqui-Inchima et al., 2001). TEV has a moderately wide host range, infecting 149 species from 19 families (Shukla et al., 1994), although most of its natural hosts belong to the family *Solanaceae*. In these plants, TEV induces stunting and mottling, necrotic etching and malformation in leaves (Shukla et al., 1994). Our results illustrate that adaptation to the new host, pepper, imposed a fitness penalty in the original tobacco host, despite the fact that both hosts belong to the same plant family. However, evolution on tobacco did not affect, for good or for bad, fitness on the alternative host.

## 2. Materials and methods

All molecular techniques employed and other protocols are described in detail in Carrasco et al. (2007a). Here only a succinct description is provided.

### 2.1. Virus clones and plants

The infectious clone pTEV-7DA (GeneBank DQ986288) was kindly provided by Prof. J.C. Carrington (Oregon State University). This clone contains a full-length cDNA of TEV and a 44 nt long poly-T tail followed by a BglII restriction site cloned into the pGEM-4 vector downstream of the SP6 promoter.

*Nicotiana tabacum* var Xanthi and *Capsicum annuum* var Marconi were grown in the greenhouse at 25 °C and 16 h light. Both host plants belong to the same plant family, the *Solanaceae*. Therefore, our experiments will simulate the emergence of a viral infection, and subsequent adaptation, at the taxonomic level of genera. TEV naturally infects both hosts. The particular clone used in this study, TEV-7DA, was isolated from tobacco plants and, therefore, we will consider tobacco as its natural host. The observed results confirmed the validity of this assumption.

### 2.2. Experimental evolution protocol

Six-week-old tobacco plants were inoculated with infectious TEV RNA. In short, 5' capped infectious RNAs were obtained from BglII linearized pTEV-7DA using SP6 mMESSAGE mMACHINE<sup>®</sup> kit (Ambion Inc.) and following the manufacturer's instructions. Transcripts were precipitated, washed with 70% ethanol and finally dissolved in two volumes of DEPC-treated water. RNA integrity and quantity was assessed by gel electrophoresis. Purified transcripts were mixed with 1:10 volume of inoculation buffer (100 mg/mL carborundum, 0.5 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3% PEG6000, pH 7.0) and plants were inoculated by gentle abrasion of the third true leaf. Symptoms appeared 5–6 days post-inoculation (dpi) in 100% of the inoculated plants. A large stock of partially purified TEV virions was prepared from these infected tobacco plants. Two mL of extraction buffer (0.5 M borate, 0.15% (w/v) sodium thioglycolate, pH 8.0) were added per gram of tissue and partially homogenized

in a Polytron (Kinematica) at maximum speed for 1 min. One mL of CHCl<sub>3</sub> and 1 mL of CCl<sub>4</sub> per gram of tissue were added and further homogenized for 1 min at maximum speed. After centrifugation, the upper aqueous phase was recovered and filtered. Precipitation of viral particles was done by adding 0.11 volumes of a solution 40% PEG6000, 17.5% NaCl (w/v) and incubation on ice with agitation for 30 min and posterior centrifugation. The pellet was suspended in 20 µL of 0.05 M borate, 5 mM EDTA (pH 8.0) buffer. This large TEV stock constituted the starting point for the evolution experiments. For conservation, 20% glycerol was added to aliquots and vials were stored at –80 °C.

Four evolution lineages were founded on *C. annuum* and four on *N. tabacum* using the TEV stock described above. Twenty one dpi, virion-containing sap was extracted from each lineage (see below). Infections were confirmed by Western blot hybridization analysis 21 dpi, using commercial anti-TEV coat protein antibodies conjugated with horseradish peroxidase (Agdia). Two grams of symptomatic tissue were grounded in 2 mL of 0.5 M phosphate 3% PEG6000 (pH 7.0) buffer. Extracts were clarified by centrifugation at 9000 rpm for 9 min at 4 °C. Whole plants rather than single systemically infected leaves were sampled to avoid the random effects associated with bottleneck colonization of different leaves by different viral subpopulations. Sap was then mixed with inoculation buffer and used to infect a batch of healthy plants by abrasion. To ensure successful transmission, four plants were inoculated per lineage. For the ancestral virus, this inoculum was approximately 100 times the median infectious dosage estimated on the corresponding plant species. This basic serial transfer protocol was repeated 15 times, randomly choosing an infected plant per lineage.

Virulence and the median number of infectious doses per gram of plant tissue were quantified for each lineage at the beginning of the experiment and every five passages, both in the same host where evolution was taking place, as well as in the alternative host (see below). Consensus sequences for several populations were obtained at passage 15.

All inoculated plants were maintained in a BSL-2 greenhouse at 25 °C and 16 h light.

### 2.3. TEV genomic RNA sequence determination

RNA was extracted using the RNeasy<sup>®</sup> Plant Mini kit (Quiagen) following manufacturer's indications. The obtained RNA was reverse-transcribed using MMuLV polymerase (Fermentas) and PCR amplified with Taq polymerase (Roche). The ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit 3.1 (Applied Biosystems) was used for cycle sequencing with fluorescently labeled dideoxynucleotides. Cycle sequencing reactions were carried out in a GeneAmp PCR System 9700 thermal cycler (Applied Biosystems). Labeled products were resolved in an ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Seven pairs of specific primers were used to amplify the 9.5 kb of TEV genome (Table 1). The resulting fragments were overlapping, facilitating the task of fragment sequence assembly. Sequences were processed and analyzed using STADEN 1.4b1.

### 2.4. Virulence measures and median infectious dosage

Here we define virulence as the degree of damage caused to a plant by virus infection, and it is assumed to be negatively correlated with host fitness (Shaner et al., 1999; Sacristán and García-Arenal, 2008). Prior to virulence assays, the infectivity of all extracts was normalized, thus plants were inoculated with equal numbers of infectious dosages (see below). All virulence assays were done in a single experimental block to minimize any

**Table 1**  
Pairs of PCR primers used for TEV genome amplification and subsequent sequencing

Primer ID	Sequence (5'–3')
Pairs used for amplification and sequencing	
PC2-10F	48-GCAATCAAGCATTCTACTTC-67
PC16-23R	1768-CCTGATATGTTCTCGATAAC-1788
PC19-26F	1455-ACACGTACTGGCTGTCAGCG-1474
PC31-39R	3189-GATAAACTGTAGACGTACAGG-3210
PC35-44F	2854-GGCTATGCTGTGACCTCTG-2874
PC46-50R	4562-CATCAATGTCAATGGTTACAC-4582
PC49-53F	4282-CCCGTGAACTCAAGATAG-4300
PC58-66R	5965-AACTCATGCTGCACTAAATC-5984
PC64-72F	5670-CAATGAACCAGTCTATTTC-5689
PC78-85R	7377-TTCITTTCTTCTGCGCTTTG-7395
PC81-89F	7059-CACAAAGCATGTGGTTAAAG-7078
PC92-96R	8762-GCAAAGTCTCATGTGTGG-8780
PC96-97F	8482-TACGATATTCCAACGACTG-8500
PC97-101R	9473-CGCACTACATAGGAGAATTAG-9493
Additional primers used for sequencing	
PC2-10R	709-GCTCTTCTGTCAATGAT-726
PC11-18F	763-CAATTGTTTCGCAAGTGTGC-781
PC7-15R	1075-ATGGTATGAAGAATGCCTC-1093
PC27-34F	2145-GGACTTCACCAAGTTTATAAGG-2166
PC24-30R	2449-TATGCACCTTGTGTGACCAT-2468
PC45-48F	3542-TTGACGCTGAGCGGAGTGATGG-3563
PC40-45R	3877-ATCCAACAGCACCTCTCAC-3895
PC54-63F	4973-TTAAGCTACACACTGTGAGAC-4995
PC51-57R	5256-CTATTGATGCATGCTAGAGTC-5276
PC73-80F	6377-TCATTACAACAAGCACTTG-6396
PC67-77R	6664-AATGCTTCCAGAAATATGCC-6682
PC90-95F	7768-GCTGTATTGAAAGTGAC-7786
PC86-91R	8084-AGGCCCAACTCTCGAAAG-8102
PC98-101F	9180-AGTACGAAACAGTGAAGTAG-9200

undesired environmental effect. The effect of infection on three plant traits was quantified, with five-fold replication, 90 dpi: plant height (*h*), fresh weight (*fw*), and dry weight (*dw*). For determination of dry weight, plants were maintained in the oven at 90 °C until no differences in weight were observed after 2 consecutive days. These determinations were each transformed into virulence according to  $v_i = 1 - X_i/\bar{X}$ ; where  $X_i$  stands for any of the three traits measured for the *i*th viral lineage on a given host and  $\bar{X}$  is the mean value for the trait measured in non-infected plants. The three measures of virulence evaluated were positively correlated (Pearson's correlation coefficient  $r \geq 0.8964$ , 48 d.f.,  $P < 0.0001$ ), meaning that infection globally affected plant biomass. Principal component analysis of the three variables revealed that 90.64% of the observed variability was explained by the major eigenvalue ( $\lambda_1 = 2.7193$ ) of the variance-covariance matrix (the second and third eigenvalues were lower than 1 and were negligible). Therefore, the three variables can be summarized into a single one by computing the first standardized canonical discriminant

function in the direction of the major eigenvalue (Sokal and Rohlf, 1995), which gives the following expression:  $v = 0.9653h + 0.9722fw + 0.9179dw$ . The biological meaning of this function is straightforward: it reflects a weighted effect of viral infection on plant biomass. Hereafter, we will call this new variable virulence and we will discuss relevant results based on this parameter.

To determine differences in the infectivity (i.e., number of infectious particles) of different virus-containing sap preparations, classic dose-response experiments were performed 21 dpi. Serial dilutions of sap (in the range 1:1 to 1:10<sup>5</sup>) were inoculated by abrasion with 10 µL on six-week old *N. tabacum* or *C. annuum* plants; five plants were inoculated with each dilution. The number of infected plants was recorded 9 dpi. (Preliminary experiments confirmed that plants not showing symptoms 9 dpi did not develop them 21 dpi and scored negative for infection in a Western blot analysis.) The log median infectious dosage (log ID<sub>50</sub>) per µL of extract was then calculated using the trimmed Spearman-Kärber method (Hamilton et al., 1977). To control for any block effect, reported values were normalized by the estimate obtained for the ancestral TEV-7DA on the same experimental block.

## 2.5. Statistical methods

Data were fitted to a mixed model II analysis of covariance (ANCOVA) (Sokal and Rohlf, 1995), where the evolution and test host types were considered as fixed factors and the evolution lineage as a random one. Passage number was treated as a covariable. The effect of all factors, the covariable, and all the interactions between factors and the covariable were included in the model.

For exploring the cost of host-range expansion, we studied the relationship between the rates of virulence change on the host where lineages were evolving and on the alternative host. The following first-order autoregressive model was fitted by maximum-likelihood techniques to the time-series virulence data from each one of the evolutionary lineages estimated on each alternative host:  $v_t - v_0 = bt + \rho_{-1}(v_{t-1} - v_0) + \varepsilon_t$ , where  $b$  reflects the linear dependence of  $v_t$  with time, i.e., the rate of virulence evolution on the host being tested,  $\rho_{-1}$  measures the correlation between consecutive virulence determinations or the pattern of similarity in the time-series data, and  $\varepsilon_t$  stands for the sampling error (Elena and Sanjuán, 2005).

All statistical analyses were done with SPSS 15.01. Unless otherwise specified, error intervals are reported as  $\pm 1$ S.E.M.

## 3. Results

### 3.1. Evolution of virulence on each host

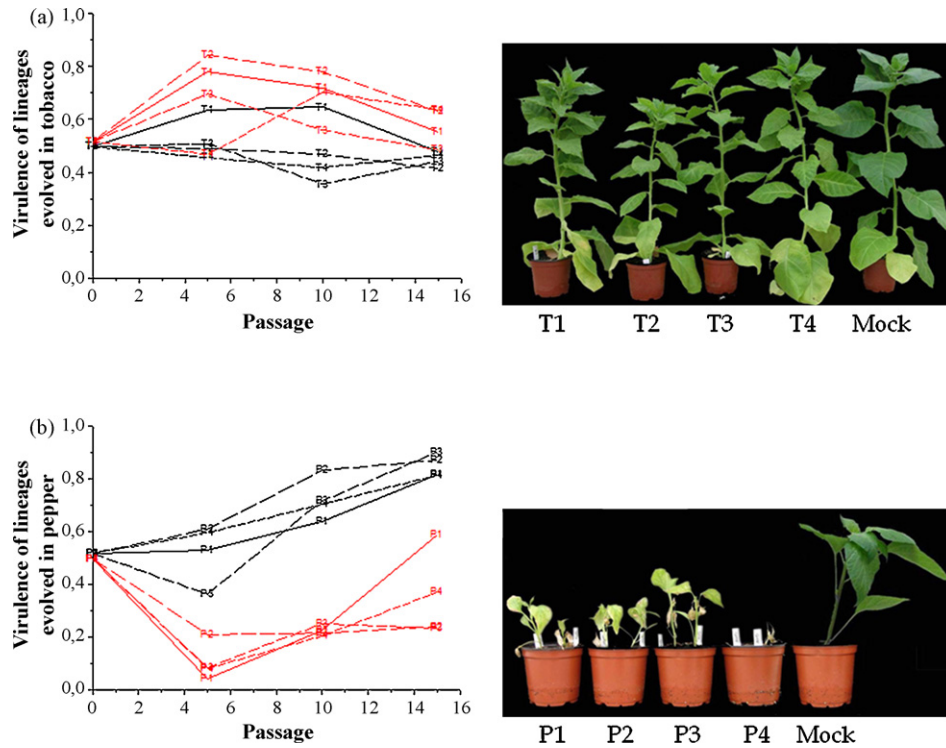
Fig. 1 shows the time-course for virulence measured on the same plant host where evolution took place and on the alternative

**Table 2**  
Mixed model II ANCOVA

Source of variation	SS <sup>a</sup>	d.f.	MS	F	P
Passage	0.0741	1	0.0741	20.6522	0.0003
Evolution host	0.4083	1	0.4083	17.8719	0.0242
Evolution host by passage	0.2962	1	0.2962	82.5165	<0.0001
Evolution host by lineage by passage	0.0581	3	0.0194	5.3914	0.0093
Test host	0.1629	1	0.1629	39.9249	0.0080
Evolution by test hosts by lineage	0.0492	3	0.0164	4.5720	0.0170
Evolution by test hosts by lineage by passage	0.0559	3	0.0186	5.1887	0.0108
Error	0.0574	16	0.0036		

Only significant terms are shown.

<sup>a</sup> SS is the type III sum of squares.



**Fig. 1.** Temporal dynamics of virulence for lineages evolved in tobacco (a) or in pepper (b). Each lineage is represented by a different symbol and line. Virulence values measured in the plant where lineages evolved are shown in black. Virulence values quantified in the heterologous plant are shown in red. Pictures show the symptoms induced by the evolved lineages on their corresponding hosts 3 months post-inoculation.

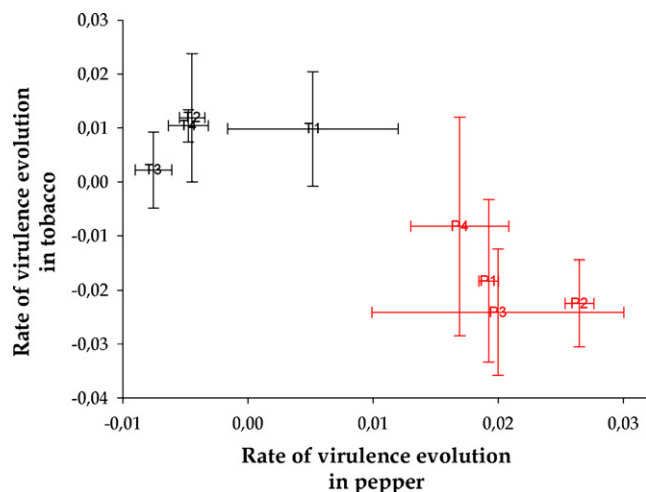
host. Table 2 shows the significant terms in the ANCOVA fitted to the data. Overall, virulence changed with passage number (Table 2;  $P = 0.0003$ ). However, this overall effect needs to be explored more carefully. Whereas evolution on the ancestral host tobacco did not lead to further increases in virulence (Fig. 1a), evolution in the new host (pepper) resulted in significant increases in virulence (Fig. 1b). This difference in the response to experimental evolution on different hosts is supported by a highly significant interaction term between the evolution host and time (Table 2;  $P < 0.0001$ ). The evolution host affected the virulence of the resulting viruses. On average, the virulence of lineages evolved on tobacco was  $0.5674 \pm 0.1344$ , whereas for those lineages evolved on pepper, the average virulence was 18.18% lower ( $0.4642 \pm 0.2818$ ), the difference being significant (Table 2;  $P = 0.0242$ ). Similarly, the plant host where virulence was evaluated also exerted an effect in the observed virulence. On average, virulence was 90.36% larger in pepper ( $0.6764 \pm 0.1396$ ) than in tobacco ( $0.3553 \pm 0.1725$ ), this difference also being significant (Table 2;  $P = 0.0080$ ). Overall, for a given evolution host, independent lineages were homogeneous in their responses, although a significant difference existed among the slopes estimated for lineages evolved on tobacco and on pepper (Table 2;  $P = 0.0093$ ), providing extra support for the conclusion that the evolutionary response was larger in the new host than in the natural one. More interestingly, heterogeneity exists in the response of each lineage to their evolution host and to the alternative host (Table 2;  $P = 0.0170$ ): whereas the average virulence of pepper-evolved lineages was 204.58% larger in pepper than in tobacco, this difference was only of 6.93% for the tobacco-evolved lineages. This finding provides the first indication for the existence of a tradeoff on virulence across hosts. Consequently, the four-way interaction term was also significant (Table 2;  $P = 0.0108$ ), confirming that the above difference in average values was paired with a difference among slopes.

In conclusion, serial passages in a new host are associated with increases in virulence, whereas passages in the ancestral host did not increase virulence. Mutations increasing virulence in the new host have a pleiotropic effect on the ancestral host and, consequently, a reduction in virulence in the ancestral hosts has been observed.

### 3.2. Cost of host-specialization

To gain further insight into the existence of evolutionary constraints for the evolution of generalist viruses, we explored the relationship between the rates of virulence evolution on the host where evolution took place and on the alternative host. Rates of virulence change were estimated from the slope of a first-order autoregressive model. Three different statistical analyses have been performed to explore the existence of a cost of host specialization. First, if molecular changes responsible for increasing virulence in the evolution host would also increase virulence in the alternative host, then a positive correlation is expected among the rates of virulence change estimated in both hosts. However, if different hosts impose different selective constraints, a tradeoff in virulence across hosts is expected, such that virulence increments in the evolution host will correspond to no change or even a decrease in virulence in the alternative host. In other words, the more virulent a lineage became in one host, the less virulent it would become in the alternative one. Fig. 2 illustrates the relationship between the rates of virulence evolution on both hosts. As predicted by the tradeoff hypothesis, a significant negative correlation exists ( $r = -0.8960$ , 6 d.f., 1-tailed  $P = 0.0013$ ) between the rates of virulence evolution on the evolution host and the alternative one. In particular, pepper-evolved lineages that show the fastest rates of virulence increase in pepper also show the fastest rates of virulence decrease in the original host of tobacco.





**Fig. 2.** Cost of host-range expansion. Scatter plot illustrating the existence of a tradeoff in virulence across different hosts. Error bars represent  $\pm 1$ S.E.M.

Tobacco-evolved lineages show minute changes of virulence in both environments.

For the second statistical test, each rate of evolution was used as an experimental determination to evaluate whether the distribution of evolution rates obtained for each of the four treatments significantly deviated from zero using one-sample *t*-tests. For tobacco-evolved lineages, the average rate of virulence evolution measured in tobacco,  $-0.0029 \pm 0.0028$ , was not significantly different from zero ( $P = 0.3722$ ), confirming that, on average, undiluted passages in the natural host did not lead to increases in its virulence. However, when the rate of evolution of the tobacco-evolved lineages was measured in pepper, a slightly significant average positive slope was detected ( $0.0096 \pm 0.0029$ ,  $P = 0.0424$ ). For pepper-evolved lineages, the obtained results support the existence of a cost associated with adaptation to a new host: the average rate of virulence evolution was significantly positive in pepper ( $0.0207 \pm 0.0020$ ,  $P = 0.0021$ ), whereas it was significantly negative in tobacco ( $-0.0183 \pm 0.0036$ ,  $P = 0.0144$ ). Furthermore, a two-step cluster analysis confirmed that the dataset depicted in Fig. 2 can be partitioned into two non-overlapping groups. Two-step cluster analysis is a classification technique used to reveal natural groupings within datasets that would otherwise not be apparent (Abonyi and Feil, 2007). For a dataset containing  $n$  data, the algorithm fits models that contain, respectively, 1, 2, ...,  $n$  groups that fulfill the requirement that the variance within each group is minimal, while the variance among groups remains maximal. For each model, Schwarz's Bayesian information criterion (BIC) was used as a measure of the goodness-of-fit and the model with the lowest BIC was considered to be the best one. In the present case, the Bayesian weight (Posada and Buckley, 2004) for the two-cluster model was 50.39%, while the sum of weights for all six models having more than two clusters was only 1.07%. The first cluster corresponds to the tobacco lineages and was centered at the point  $(-0.0029, 0.0096)$ , whereas the second cluster corresponds to the pepper lineages and its centroid was  $(0.0207, -0.0183)$ . The asymmetry in the signs of Cartesian coordinates of both centroids provides further support for the tradeoff hypothesis.

For the third statistical analysis, we focused only on the sign of the estimated rates of evolution and used Fisher's exact tests to evaluate whether the distribution of signs differed among test host for each type of evolution host. Under the null hypothesis of no tradeoff, signs will distribute evenly across test plants. However, if the predicted tradeoff exists, then an excess of positive signs in the evolution environment associated with an excess of negative signs

in the alternative environment is expected. In the case of tobacco-evolved lineages, the distribution of signs did not differ among test hosts ( $P = 0.1429$ ): all four values were positive when estimated in tobacco, whereas three lineages showed negative rates of evolution when evaluated in peppers. For the case of pepper-evolved lineages, the difference in the distribution of signs was significant ( $P = 0.0286$ ): all four lineages had positive rates when tested in pepper, but negative rates when evaluated in tobacco.

Therefore, all the above statistical tests, each based on rather different assumptions, converge to the same result: on average, pepper-evolved lineages show high rates of virulence evolution in pepper at the cost of evolving lower virulence in tobacco, while the tobacco-evolved lineages show no change in virulence in tobacco with changes of virulence in pepper that may be either small or not statistically significant.

### 3.3. Association between virulence and virus accumulation

Next, we explored whether the observed increases in virulence were associated with increases in the level of virus accumulation. As a measure of the accumulation of biologically active viral particles, log median infectivity ( $\log ID_{50}$ ) was used. Time-series  $\log ID_{50}$  data were analyzed as above and the obtained results support the conclusions drawn for virulence (data not shown). A correlation coefficient between virulence and viral load was computed for each evolutionary lineage on each alternative plant host (Table 3). Only lineage tobacco-2 had a significant correlation coefficient between both variables when they were measured in tobacco (Table 3). However, these 16 correlations can be used as individual observations to test whether, on average, the association between virulence and viral load was affected by the different experimental treatments. Table 4 shows the results of the two-way ANOVA in which both evolution and test hosts were treated as fixed factors ( $R^2 = 0.8256$ ,  $F_{4,16} = 14.2031$ ,  $P = 0.0002$ ). Overall, both main factors were significant; indicating that the association between virulence and viral load depended both on the host where their virological properties were estimated (Table 4,  $P = 0.0052$ ). The average correlation coefficient for pepper-evolved lineages ( $0.8062 \pm 0.0476$ ) was significant (one-sample *t*-test  $P < 0.0001$ ) and  $\sim 3.5$  times larger than the average correlation coefficient estimated for the tobacco-evolved lineages ( $0.2308 \pm 0.2880$ ), which indeed was not significant ( $P = 0.4493$ ). Similarly, the association between both variables was also  $\sim 4.5$  times stronger – and significant – when they were measured in pepper ( $0.8491 \pm 0.0479$ ;  $P < 0.0001$ ) than when measured in tobacco ( $0.1879 \pm 0.2745$ ,  $P = 0.5157$ ). A significant interaction has been detected between the evolution and test hosts (Table 4,  $P = 0.0152$ ). Fig. 3 helps to better understand the

**Table 3**

Pearson's correlation coefficient between viral load and virulence computed for each evolving lineage in both alternative plant hosts

Evolution host	Lineage	Test host			
		Tobacco		Pepper	
		<i>r</i>	<i>P</i> <sup>a</sup>	<i>r</i>	<i>P</i> <sup>a</sup>
Tobacco	1	−0.9658	0.1671	0.8254	0.3819
	2	−0.9997	0.0152	0.9571	0.1871
	3	−0.0120	0.9924	0.5677	0.6157
	4	0.4783	0.6821	0.9950	0.0637
Pepper	1	0.5984	0.5916	0.8906	0.3006
	2	0.6271	0.5684	0.8917	0.2990
	3	0.9668	0.1646	0.7627	0.4477
	4	0.8098	0.3992	0.9024	0.2836

<sup>a</sup> All test have 1 d.f.

**Table 4**

Two-way ANOVA testing the effect of different experimental treatments on the association between virulence and viral load (correlation coefficients shown in Table 3)

Source of variation	SS <sup>a</sup>	d.f.	F	P
Evolution host	1.3245	1	8.7664	0.0119
Test host	1.7488	1	11.5746	0.0052
Evolution by test hosts	1.2095	1	8.0052	0.0152
Error	1.8131	12		

<sup>a</sup> Type III sum of squares.

nature of this interaction. Fig. 3a illustrates the correlations when both variables were measured in the same host in which evolution took place. On average, no significant association was found for the tobacco-evolved virus ( $-0.3748 \pm 0.3651$ ,  $P = 0.3801$ ). However, when both variables were estimated for the pepper-evolved lineages, viral load was positively associated with the degree of virulence ( $0.8619 \pm 0.0332$ ,  $P = 0.0001$ ). When virulence and viral load were measured in the heterologous host (Fig. 3b), both tobacco-evolved ( $0.8363 \pm 0.0967$ ,  $P = 0.0032$ ) and pepper-evolved lineages ( $0.7505 \pm 0.0860$ ,  $P = 0.0032$ ) showed average positive associations between both variables. Hence, the significant interaction term detected in the ANOVA was due to the switch in the average sign of the correlation observed for the tobacco-evolved lineages across test hosts, while the

relationship for the pepper-evolved lineages remained constant across hosts.

Therefore, in conclusion, virulence and the number of infectious particles accumulated are, in general, positively associated traits. However, this association is weaker and variable in sign for the tobacco-evolved lineages.

### 3.4. Molecular changes associated with host switch

Finally, quasi-complete full-genome consensus sequences were determined for two randomly chosen tobacco-evolved and the four pepper-evolved lineages at passage 15. The degree of genome coverage ranged from 92.23 to 97.71% (Table 5).

Regarding the tobacco-evolved lineages, both presented synonymous and nonsynonymous changes. Interestingly, both showed nonsynonymous changes in the Nla and Nib genes. Lineage tobacco-1 has a K to E change in the protease domain of Nla that involves changing a positive net charge to a negative one. This non-conservative substitution is likely to have a strong impact on the properties of the peptide (Table 3). Nla-Pro is the major proteinase of potyviruses and is involved in processing the polyprotein in *cis* and in *trans* to produce functional products (Urcuqui-Inchima et al., 2001). Lineage tobacco-1 also has a non-conservative H to P change in the Nib gene. This change may have a strong effect on protein structure since a net positive charge has been changed by an imino acid that induces  $\beta$  turns in tertiary structure. Nib is the RNA-dependent RNA-polymerase (RdRp) of potyviruses (Urcuqui-Inchima et al., 2001). The first nonsynonymous change in lineage tobacco-2 is an A (small apolar) to T (polar) change in the Nla-VPg gene. VPg is involved in replication and host specificity. VPg appears covalently attached to the 5' end of viral RNA and provides the required OH residue for priming transcription (Urcuqui-Inchima et al., 2001). The second change in lineage tobacco-2 may have a small impact in Nib structure, since it replaces a basic polar amino acid Q with another of similar chemical properties (H).

**Table 5**

Molecular changes identified in consensus sequences obtained at passage 15

Lineage	Protein	Nucleotide change	Amino acid change <sup>a</sup>
Tobacco-1 <sup>b</sup>	P1	C195T polymorphic	
	P1	C741T	
	Nla-Pro	A6805G	K2269E
	Nib	C8435A	H2812P
Tobacco-4 <sup>b</sup>	Nla-VPg	G5761A	A1921T
	Nib	A7611C	Q2537H
	Nib	T8412C	
Pepper-1 <sup>c</sup>	HC-Pro	T1241C	V414A
Pepper-2 <sup>d</sup>	HC-Pro	T1241C	V414A
	Nib	T7956C	
Pepper-3 <sup>e</sup>	5'-UTR	A96T	
	HC-Pro	T1241C	V414A
	Nib	T7956C	
Pepper-4 <sup>f</sup>	HC-Pro	A1905G	
	CI	G3714A polymorphic	
	Nib	C7989T	

<sup>a</sup> Numeration corresponds to the amino acid residue in the polyprotein.

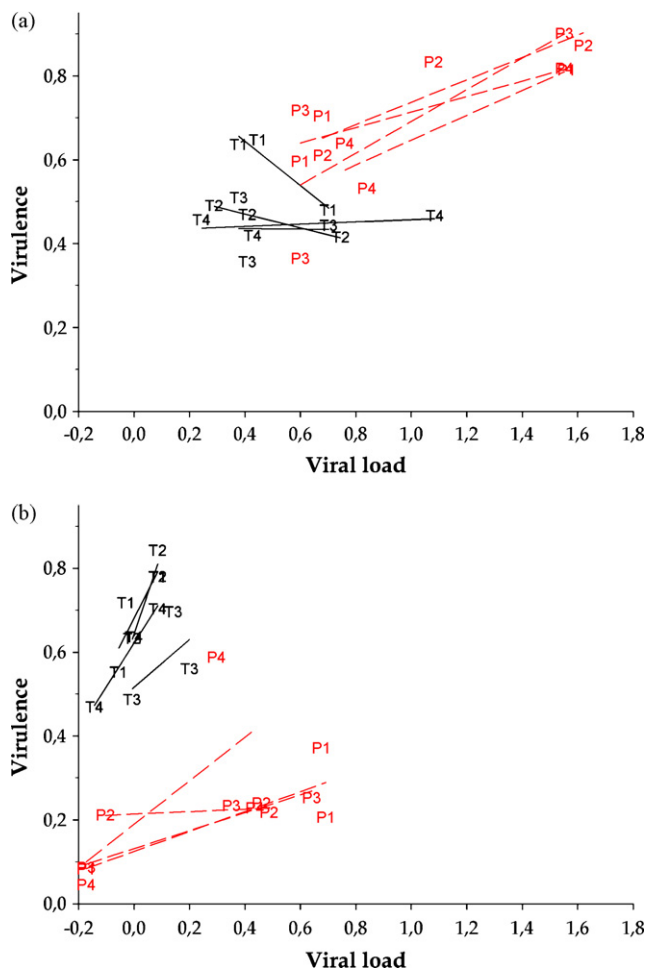
<sup>b</sup> Sequenced from nucleotide site 80 to 9400 (97.71% coverage).

<sup>c</sup> Sequenced from 80 to 9400, except regions 8445–8518 and 9169–9235 (95.29% coverage).

<sup>d</sup> Sequenced from 60 to 9400, except regions 4237–4340, 7147–7166, and 8510–8569 (96.00% coverage).

<sup>e</sup> Sequenced from 80 to 9400, except region 2845–2884 (97.30% coverage).

<sup>f</sup> Sequenced from 80 to 9400, except regions 1400–1456, 4580–4676, 5420–5726, 6992–7060, and 8422–8483 (92.23% coverage).



**Fig. 3.** Association between virulence and viral load (measured as  $\log ID_{50}$ ). (a) Both variables are quantified in the same plant host where evolution took place. (b) Both variables estimated in the heterologous plant host. Tobacco-evolved lineages are indicated in black whereas pepper-evolved lineages are indicated by red symbols. Lines are drawn to illustrate the tendencies.

Regarding the pepper-evolved lineages, in addition to several other lineage-specific synonymous substitutions, three lineages share the same amino acid replacement (V to A) in the HC-Pro protein. This convergent amino acid replacement involves two apolar amino acids and replacing a small linear side chain by a branched, although still short, one. HC-Pro is a multifunctional protein involved in several important functions (Urcuqui-Inchima et al., 2001): HC-Pro (i) acts as proteinase during the autolytic processing of the viral polyprotein, (ii) interacts with the stylet of aphids during transmission, (iii) displays RNA binding activity and is involved in genome amplification, (iv) is required for entry into and exit from the vascular system, (v) interferes with the 20S proteasome, and (vi) is essential for symptom development. Therefore, it participates in replication, systemic movement, and vector transmission. Mutagenesis analyses have allowed the definition of several functional domains in potyvirus HC-Pro, although some functions are overlapping. Oversimplifying, the N-terminal region is essential for the transmission process, but dispensable for infection. In the C-terminal region, the proteinase and movement domains overlap, and the central region is implicated in RNA silencing, genome amplification and overlaps with the movement domain (Kasschau et al., 1997; Plisson et al., 2003; Varrelmann et al., 2007). Amino acid 414 belongs to the RNA silencing suppressor domain, more precisely to the region which is not overlapping with movement function (see Fig. 5 in Varrelmann et al., 2007). Therefore, it is easy to imagine that this change may alter the suppressor activity of HC-Pro in response to slight differences in RNA silencing activity between tobacco and pepper.

Surprisingly, not a single nonsynonymous change has been identified in lineage pepper-4. This may simply reflect the fact that sequencing effort on this lineage had the lowest coverage or, alternatively, that synonymous changes may also play a role in virus adaptation. Also, in good agreement with our suggestion that mutation HC-Pro V414A is responsible for the aggressive symptoms in peppers, lineage pepper-4 shows the lowest virulence value in pepper and the largest virulence value in tobacco (Fig. 2).

#### 4. Discussion

The evolution of host range in RNA viruses is one topic that has received considerable attention due its implication for the understanding of emerging infectious diseases. Broadly speaking, plant viruses have highly variable host ranges: some infect only one or a few related species (i.e., they are specialists) while others can infect a wide range of hosts from different taxonomic groups (i.e., they are generalists). Provided that generalist parasites will have access to potentially unlimited hosts, the question is why most parasites are specialized in a few hosts. It has been suggested that selection should favor specialist parasites because there are tradeoffs limiting the fitness of generalists in any of the alternative hosts or because evolution proceeds faster with narrower niches (Woolhouse et al., 2001). It is widely accepted that adaptation to a specific host is often coupled with fitness losses in alternative ones simply because mutations that are beneficial in the first might be deleterious in the alternative (Fry, 1996). This antagonistic pleiotropy could limit the range of adaptation and promotes the evolution of specialization. Here, we have experimentally addressed whether adaptation of TEV to a novel host is concomitant with a reduction in the degree of adaptation to its natural host; despite the fact that both the original and the new host belong to the *Solanaceae* family. We have shown that after 15 serial undiluted passages of TEV into *C. annuum* plants both virulence and virus accumulation significantly increased (Fig. 1b). However, this increase in viral fitness in pepper was paired with a decrease in

these two variables in the original host *N. tabacum*. Furthermore, evolution lineages maintained for the same number of serial transfers into tobacco plants did not show any increase in virulence or in viral load, suggesting that TEV fitness was already maximized in the original host tobacco (Fig. 1a).

##### 4.1. Concordance with previous results

Many studies can be found in the plant virology literature in which the qualitative costs associated with viruses expanding their host range from sensitive to resistant plant genotypes had been explored. For example, Jenner et al. (2002) went a step further and quantified the fitness penalty on wildtype plants paid by *Turnip mosaic potyvirus* after expanding its host range from wildtype turnips to plants bearing the *TuRB01* resistance gene. The fitness of three resistance-breaking genotypes, CZE1, CDN1, and v35Tunos + 5570A > G, was evaluated on wildtype turnips by multi-day competition assays against the wildtype-specialist isolate UK1. The fitness costs associated with host range were 32.36% for CZE1, 53.91% for v35Tunos + 5570A > G, and 100% for CDN1. These results support the idea that any mutation that confers the ability to infect a new host has a strong pleiotropic effect on the ancestral one. In another recent study, Wallis et al. (2007) have shown that following serial passages in an herbaceous host (*Pisum sativum*), *Plum pox potyvirus* increased its infectivity, viral load, and virulence in the new host with a concomitant reduction in transmission efficiency in peaches, the original host, suggesting that host-range expansion is a costly trait. One of the most remarkable recent examples of fast host-specific adaptation is the convergent evolution of *Pelargonium flower break carmovirus* (PFBV) populations adapted to *Chenopodium quinoa* (Rico et al., 2006). PFBV isolates maintained for long time on quinoa leaves have five specific non-contiguous amino acid substitutions in the coat protein (CP), which are not present in other natural isolates. We can define this quinoa-specific pattern of amino acids at the relevant sites as VFYII. When a Spanish isolate from geranium, containing the wildtype pattern ASHMY, was mechanically inoculated on quinoa leaves, the viral population generated right after the first passage had already fixed two of the quinoa-specific changes (ASYMI), and only four serial passages were necessary to restore the entire VFYII quinoa-specific pattern (Rico et al., 2006). The fact that this pattern has never been found in the natural host, not even incomplete, suggests that it may impose a strong burden for viral fitness on geranium.

*In vitro* evolution experiments in which RNA viruses evolve in and adapt to animal cell cultures have provided good insights into the question of virus specialization. A common result of these studies is that viral populations evolved in a single cell host become specialist, paying fitness costs in any alternative environment (Turner and Elena, 2000; Remold et al., 2008). However, these studies have also explored the effect of temporal and spatial host heterogeneity. A common observation of these studies is that viral populations readily adapt to heterogeneous temporally fluctuating host cell types, becoming generalists without paying fitness costs in any of the alternative hosts (Turner and Elena, 2000; Remold et al., 2008). However, when host heterogeneity arises spatially, then the extent of adaptation to each host cell type strongly depends on the rate of migration among different hosts (Cuevas et al., 2003). Migration among heterogeneous host types selects for generalist viruses with increased fitness in all the alternative hosts. By contrast, in the absence of migration, viral populations become specialized for their host cell type. This result supports the general view that migration among hosts must be sufficiently low relative to the strength of selection to generate local adaptation to each host (Brown and Pavlovic, 1992; Holt,

1996; Kawecki, 2000). Indeed, the conditions for the coexistence of specialists in a heterogeneous environment are very restrictive. If the selective differences among hosts are not so large, as may be the case for plants belonging to the same family, the balance of production from each host must be roughly equal in order to maintain diversity (Maynard Smith and Hoekstra, 1980; van Tienderen, 1991). This implies that there must be lots of opportunities for generalists to evolve in heterogeneous environments, even if selection favors specialization to the most productive host in the short term.

#### 4.2. On the relationship between virulence and virus accumulation

Most theoretical models seeking to explain the evolution of pathogen virulence assume that it is a side effect of within-host replication and accumulation, that is, its within-host fitness (Levin, 1996; Ebert, 1998; Brown et al., 2006). Despite the obvious interest of this question, data directly testing the existence of the predicted correlation are, at best, scarce, and the molecular basis of virulence is poorly understood. To provide some insight into this question, we explored the relationship between virulence and viral load (measured as  $\log ID_{50}$ ). We found that whenever virulence increased upon adaptation to a new host (pepper), the median number of infectious particles per gram of infected tissue also increased. Two different mechanisms can explain this correlation. On one hand, selection may operate to maximize viral accumulation, virulence being just a side-effect. On the other hand, selection may be optimizing the interaction between viral proteins and host factors in such a way that a virulent interaction is generated; in such a situation, increases in virus accumulation are side-effects. For example, virulence would not depend on within-host replication if the extent of damage is not proportional to the amount of viral particles, as is the case in the hypersensitive response to plant infection (Morel and Dangl, 1997), or if expressing the systemic acquired resistance pathway is costly for the plant, as has been reported for *Arabidopsis thaliana* (Heidel et al., 2004), or if allocating resources to defense detract them from vegetative growth or reproductive effort (Heil, 2001). These two possibilities need to be further explored. Examples exist of uncorrelated changes in plant virus fitness and virulence. For instance, it has been shown that when *Barley stripe mosaic hordevirus* was evolved by serial horizontal transfers, its virulence increased with no concomitant increase in viral load (Stewart et al., 2005). Despite having radically different virulence, necrogenic and non-necrogenic variants of *Cucumber mosaic cucumovirus* did not differ in their accumulation level in tomato (Escrivu et al., 2000). In a recent study, a lack of correlation between fitness and virulence has been reported for genotypes of TEV differing in a single nucleotide substitution (Carrasco et al., 2007b). All together, these findings support the hypothesis that virulence may not be necessarily a direct consequence of within-host replication efficiency.

Interestingly, we observed that the tobacco-evolved lineages showed a positive association between virulence and virus accumulation only in the alternative pepper host. However, this association was not present in tobacco. It can be speculated that the past evolutionary history of association between TEV-7DA and tobacco may have selected for a non-virulent interaction in which virus accumulation occurs with no concomitant expression of strong symptoms (by some of the mechanisms mentioned in the previous paragraph). However, when TEV-7DA is challenged with a new host, or when it evolves for short periods of time (like the one simulated in our experiment) in a new host, the compatibility mechanisms that couple virus accumulation from virulence may be broken and virulence gets expressed.

#### 4.3. Host constraints and evolutionary convergence at the molecular level

Three out of four pepper-evolved lineages share the same V141A substitution in the RNA silencing suppressor domain of the multifunctional protein HC-Pro. This represents a clear example of evolutionary convergence at the molecular level. Convergent evolution at the molecular level is not controversial as long as it can be reconciled with the neutralist and the selectionist theories. The neutral theory suggests that convergences are simply accidents, whereas within the framework of selectionism, there are two qualifications for convergences. The first explanation considers convergences as being adaptive and the result of organisms facing the same environment (as in the case of our experiments) with a few alternative pathways of adaptation (as expected for compacted genomes). Second, keeping in mind the model of clonal interference, beneficial mutations become fixed in an ordered way (Gerrish and Lenski, 1998), with the best possible candidate fixing first, then the second best candidate and so on. This implies that, given a large enough population size to make clonal interference an important evolutionary factor, we should always expect the same mutations getting fixed. Future experiments will address the adaptive value of V141A on pepper and whether it may explain the observed pleiotropy effect on tobacco.

Evolutionary convergences at the molecular level have been regularly described during the experimental adaptation of viral lineages challenged with identical artificial environmental conditions (Bull et al., 1997; Wichman et al., 1999; Cuevas et al., 2002; Rico et al., 2006), as well as with more natural situations. For example, it is also a relatively widespread observation among HIV-1 clones isolated from patients treated with different antiviral drugs; parallel changes are frequent, often following a common order of appearance (Nijhuis et al., 1999; Martínez-Picado et al., 2000). Subsequent substitutions may confer increasing levels of drug resistance or, alternatively, may compensate for deleterious pleiotropic effects of earlier mutations.

Someone skeptical of our interpretation of genomic convergence in independently evolved lineages as the result of (i) selective constraints imposed by the new host and (ii) a limited number of genetic solutions available to natural selection as a consequence of the compactness of RNA genomes, may argue that our evolution lineages were all started from a TEV population purified from tobacco plants and that this population may have already been polymorphic for the V414A substitution. In such a scenario, lineages would share the V414A allele not because it bestowed any fitness advantage in pepper, but simply because it was fixed by drift at the first infectious passage. However, we consider this argument as very unlikely for the following reasons: First, the original viral stock was obtained by mixing virus obtained from several tobacco plants. It is highly unlikely that the V414A mutation independently appeared and reached high frequency in all the independent plants used to create the stock. If, as the drift hypothesis suggests, mutation V414A was already present in the initial stock, its frequency in the stock must be close to fixation to make it realistic that it got fixed in three independent lineages after three independent bottleneck events. Second, to further diminish the likelihood of the drift argument, these three fixation events of the same neutral mutation only happened in pepper plants and not in tobacco plants. If the V414A mutation was neutral, as is necessary for drift fixation and long-term stability, then this mutation would also be common on the tobacco lineages, something which contradicts our observations.



## Acknowledgements

Funding was provided by grants from the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia (BFU2006-14819-C02-01/BMC) and the Generalitat Valenciana (ACOMP07/263). P.A.R. was supported by a predoctoral fellowship from the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia. We thank our labmates for comments and fruitful discussion and Dr. Lynne Yenush for reading the manuscript and English improvement. The very helpful comments from two anonymous reviewers are also welcomed.

## References

- Abonyi, J., Feil, B., 2007. Cluster Analysis for Data Mining and System Identification. Birkhäuser, Basel, Switzerland.
- Brown, J.S., Pavlovic, N.B., 1992. Evolution in heterogeneous environments: effects of migration on habitat specialization. *Evol. Ecol.* 6, 360–382.
- Brown, N.F., Wickham, M.E., Coombes, B.K., Finaly, B.B., 2006. Crossing the line: selection and evolution of virulence traits. *PLoS Pathog.* 2, e42.
- Bull, J.J., Badgett, M.R., Wichman, H.A., Huelsenbeck, J.P., Hillis, D.M., Gulati, A., Ho, C., Molineux, I.J., 1997. Exceptional convergent evolution in a virus. *Genetics* 147, 1497–1507.
- Carrasco, P., Daròs, J.A., Agudelo-Romero, P., Elena, S.F., 2007a. A real-time RT-PCR assay for quantifying the fitness of *Tobacco etch virus* in competition experiments. *J. Virol. Methods* 139, 181–188.
- Carrasco, P., de la Iglesia, F., Elena, S.F., 2007b. Distribution of fitness and virulence effects caused by single-nucleotide substitutions in *Tobacco etch virus*. *J. Virol.* 81, 12979–12984.
- Combes, C., 2001. Parasitism. University of Chicago Press, Chicago, USA.
- Cuevas, J.M., Elena, S.F., Moya, A., 2002. Molecular basis of adaptive convergence in experimental populations of RNA viruses. *Genetics* 162, 533–542.
- Cuevas, J.M., Moya, A., Elena, S.F., 2003. Evolution of RNA virus in spatially structured heterogeneous environments. *J. Evol. Biol.* 16, 456–466.
- Dennehy, J.J., Friedenber, N.A., Holt, R.D., Turner, P.E., 2006. Viral ecology and the maintenance of novel host use. *Am. Nat.* 167, 429–439.
- Duffy, S., Turner, P.E., Burch, C.L., 2006. Pleiotropic costs of niche expansion in the RNA bacteriophage  $\phi 6$ . *Genetics* 172, 751–757.
- Ebert, D., 1998. Experimental evolution of parasites. *Science* 282, 1432–1435.
- Ehrlich, P.R., Raven, P.H., 1964. Butterflies and plants: a study in coevolution. *Evolution* 18, 586–608.
- Elena, S.F., Sanjuán, R., 2005. RNA viruses as complex adaptive systems. *Biosystems* 81, 31–41.
- Escriu, F., Fraile, A., García-Arenal, F., 2000. Evolution of virulence in natural populations of the satellite RNA of *Cucumber mosaic virus*. *Phytopathology* 90, 480–485.
- Fry, J.D., 1996. The evolution of host specialization: are trade-offs overrated? *Am. Nat.* 148, S84–S107.
- Gandon, S., Capowiez, Y., Dubois, Y., Michalak, Y., Olivieri, I., 1996. Local adaptation and gene-for-gene coevolution in a metapopulation model. *Proc. R. Soc. Lond. B* 263, 1003–1009.
- Gerrish, P.J., Lenski, R.E., 1998. The fate of competing beneficial mutations in an asexual population. *Genetica* 102–103, 127–144.
- Hamilton, M.A., Russo, R.C., Thurston, R.V., 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 11, 714–719.
- Heidel, A.J., Clarke, J.D., Antonovics, J., Dong, X., 2004. Fitness costs of mutations affecting the systemic acquired resistance pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 168, 2197–2206.
- Heil, M., 2001. The ecological concept of costs of induced systemic resistance (ISR). *Eur. J. Plant Pathol.* 107, 137–146.
- Holt, R.D., 1996. Adaptive evolution in source-sink environments: direct and indirect fitness effects of density-dependence on niche evolution. *Oikos* 75, 182–192.
- Jenner, C.E., Wang, X., Ponz, F., Walsh, J.A., 2002. A fitness cost for *Turnip mosaic virus* to overcome host resistance. *Virus Res.* 86, 1–6.
- Kaltz, O., Shykoff, J., 1998. Local adaptation in host–parasite systems. *Heredity* 81, 361–370.
- Kasschau, K.D., Cronin, S., Carrington, J.C., 1997. Genome amplification and long-distance movement functions associated with the central domain of *Tobacco etch potyvirus* helper component-proteinase. *Virology* 228, 251–262.
- Kawecki, T.J., 1994. Accumulation of deleterious mutations and the evolutionary cost of being a generalist. *Am. Nat.* 144, 833–838.
- Kawecki, T.J., 2000. Adaptation to marginal habitats: contrasting influence of the dispersal rate on the fate of alleles with small and large effects. *Proc. R. Soc. Lond. B* 267, 1315–1320.
- Lajeunesse, M.J., Forbes, M.R., 2001. Host range and local parasite adaptation. *Proc. R. Soc. Lond. B* 269, 703–710.
- Levin, B.R., 1996. The evolution and maintenance of virulence in microparasites. *Emerg. Infect. Dis.* 2, 93–102.
- Maclean, R.C., 2005. Adaptive radiation in microbial microcosms. *J. Evol. Biol.* 18, 1376–1386.
- Malpica, J.M., Sacristán, S., Fraile, A., García-Arenal, F., 2006. Association and host selectivity in multi-host pathogens. *PLoS ONE* 1, e41.
- Martínez-Picado, J., DePasquale, M.P., Kartsonis, N., Hanna, G.J., Wong, J., Finzi, D., Rosenberg, E., Gunthard, H.F., Sutton, L., Savaia, A., Petropoulos, C.J., Hellmann, N., Walker, B.D., Richman, D.D., Siciliano, R., D'Aquila, R.T., 2000. Antiretroviral resistance during successful therapy of HIV type 1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 10948–10953.
- Maynard Smith, J., Hoekstra, R., 1980. Polymorphism in a varied environment: how robust are the models? *Genet. Res.* 35, 45–57.
- Morel, J.B., Dangi, J.L., 1997. The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. *Cell Death Differ.* 4, 671–683.
- Nijhuis, M., Schuurman, R., de Jong, D., Erickson, J., Gustchina, E., Albert, J., Schipper, P., Gulnik, S., Boucher, C.A.B., 1999. Increased fitness of drug resistant HIV-1 protease as a result of acquisition of compensatory mutations during suboptimal therapy. *AIDS* 13, 2349–2359.
- Plisson, C., Drucker, M., Blanc, S., German-Retana, S., Le Gall, O., Thomas, D., Bron, P., 2003. Structural characterization of HC-Pro, a plant virus multifunctional protein. *J. Biol. Chem.* 278, 23753–23761.
- Posada, D., Buckley, T.R., 2004. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Syst. Biol.* 53, 793–808.
- Remold, S.K., Rambaut, A., Turner, P.E., 2008. Evolutionary genomics of host adaptation in vesicular stomatitis virus. *Mol. Biol. Evol.* 25, 1138–1147.
- Rico, P., Ivars, P., Elena, S.F., Hernández, C., 2006. Insights into the selective pressures restricting *Pelargonium flower break virus* genome variability: evidence for host adaptation. *J. Virol.* 80, 8124–8132.
- Sacristán, S., García-Arenal, F., 2008. The evolution of virulence and pathogenicity in plant pathogen populations. *Mol. Plant Pathol.* 9, 369–384.
- Shaner, G., Stromberg, E.L., Lacy, G.H., Barker, K.R., Pirone, T.P., 1999. Nomenclature and concepts of pathogenicity and virulence. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30, 47–66.
- Shukla, D.D., Ward, C.W., Brunt, A.A., 1994. The Potyviridae. CAB International, Wallingford.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 1995. Biometry, 3rd ed. Freeman, New York.
- Stewart, A.D., Logsdon Jr., J.M., Kelly, S.E., 2005. An empirical study of the evolution of virulence under both horizontal and vertical transmission. *Evolution* 59, 730–739.
- Thompson, J.N., 1994. The Coevolutionary Process. University of Chicago Press, Chicago.
- Turner, P.E., Elena, S.F., 2000. Cost of host radiation in an RNA virus. *Genetics* 156, 1465–1470.
- Urcuqui-Inchima, S., Haenni, A.L., Bernardi, F., 2001. Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus Res.* 74, 157–175.
- van Tienderen, P.H., 1991. The evolution of generalists and specialists in spatially structured heterogeneous environments. *Evolution* 45, 1317–1331.
- Varrelmann, M., Maiss, E., Pilot, R., Palkovics, L., 2007. Use of pentapeptide-insertion scanning mutagenesis for functional mapping of the *Plum pox virus* helper component proteinase suppressor of gene silencing. *J. Gen. Virol.* 88, 1005–1015.
- Wallis, C.M., Stone, A.L., Sherman, D.J., Damsteegt, V.D., Gildow, F.E., Schneider, W.L., 2007. Adaptation of *Plum pox virus* to a herbaceous host (*Pisum sativum*) following serial passages. *J. Gen. Virol.* 88, 2839–2845.
- Whitlock, M.C., 1996. The Red Queen beats the jack-of-all-trades: the limitations on the evolution of phenotypic plasticity and niche breadth. *Am. Nat.* 148, S65–S77.
- Wichman, H.A., Badgett, M.R., Scott, L.A., Boulianne, C.M., Bull, J.J., 1999. Different trajectories of parallel evolution during viral evolution. *Science* 285, 422–424.
- Woolhouse, M.E.J., Taylor, L.H., Haydon, D.T., 2001. Population biology of multihost pathogens. *Science* 292, 1109–1112.
- Woolhouse, M.E.J., Webster, J.P., Domingo, E., Charlesworth, B., Levin, B.R., 2002. Biological and biomedical implications of the co-evolution of pathogens and their hosts. *Nat. Genet.* 32, 569–577.



## PARTE II

---

Capítulo 2. Cambios en el perfil de expresión génica de  
*Arabidopsis thaliana* después de la infección por el  
*Virus de grabado del tabaco*.





## Research

## Open Access

### Changes in the gene expression profile of *Arabidopsis thaliana* after infection with *Tobacco etch virus*

Patricia Agudelo-Romero<sup>1</sup>, Pablo Carbonell<sup>1</sup>, Francisca de la Iglesia<sup>1</sup>, Javier Carrera<sup>1</sup>, Guillermo Rodrigo<sup>1</sup>, Alfonso Jaramillo<sup>2</sup>, Miguel A Pérez-Amador<sup>1</sup> and Santiago F Elena<sup>\*1</sup>

Address: <sup>1</sup>Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-UPV, 46022, València, Spain and <sup>2</sup>Laboratoire de Biochimie, École Polytechnique, 91128, Palaiseau, France

Email: Patricia Agudelo-Romero - sanagro@ibmcp.upv.es; Pablo Carbonell - pcarbone@ibmcp.upv.es; Francisca de la Iglesia - pdelai@ibmcp.upv.es; Javier Carrera - javier.carrera@synth-bio.com; Guillermo Rodrigo - guirodta@ibmcp.upv.es; Alfonso Jaramillo - alfonso.jaramillo@polytechnique.edu; Miguel A Pérez-Amador - mpereza@ibmcp.upv.es; Santiago F Elena\* - sfelena@ibmcp.upv.es

\* Corresponding author

Published: 7 August 2008

Received: 29 May 2008

Virology Journal 2008, 5:92 doi:10.1186/1743-422X-5-92

Accepted: 7 August 2008

This article is available from: <http://www.virologyj.com/content/5/1/92>

© 2008 Agudelo-Romero et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## Abstract

**Background:** *Tobacco etch potyvirus* (TEV) has been extensively used as model system for the study of positive-sense RNA virus infecting plants. TEV ability to infect *Arabidopsis thaliana* varies among ecotypes. In this study, changes in gene expression of *A. thaliana* ecotype Ler infected with TEV have been explored using long-oligonucleotide arrays. *A. thaliana* Ler is a susceptible host that allows systemic movement, although the viral load is low and syndrome induced ranges from asymptomatic to mild. Gene expression profiles were monitored in whole plants 21 days post-inoculation (dpi). Microarrays contained 26,173 protein-coding genes and 87 miRNAs.

**Results:** Expression analysis identified 1727 genes that displayed significant and consistent changes in expression levels either up or down, in infected plants. Identified TEV-responsive genes encode a diverse array of functional categories that include responses to biotic (such as the systemic acquired resistance pathway and hypersensitive responses) and abiotic stresses (droughtness, salinity, temperature, and wounding). The expression of many different transcription factors was also significantly affected, including members of the R2R3-MYB family and ABA-inducible TFs. In concordance with several other plant and animal viruses, the expression of heat-shock proteins (HSP) was also increased. Finally, we have associated functional GO categories with KEGG biochemical pathways, and found that many of the altered biological functions are controlled by changes in basal metabolism.

**Conclusion:** TEV infection significantly impacts a wide array of cellular processes, in particular, stress-response pathways, including the systemic acquired resistance and hypersensitive responses. However, many of the observed alterations may represent a global response to viral infection rather than being specific of TEV.

## Background

Virus infection typically alters host's physiology, diverting almost any sort of metabolite for the production of virus-specific components, and actively manipulates antiviral defenses. As a response to viral infection, cells may compensate by over- or under-expressing certain metabolic pathways, including specific antiviral responses (e.g., the interferon or RNA silencing pathways). Taken together, all these alterations determine the strength and type of symptoms displayed by infected organisms. In the case of plant viruses, in the absence of a hypersensitive response (i.e., apoptotic cell death), cells that have successfully supported viral replication do not die but retain large amounts of viral particles while the infections spreads out through the plasmodesmata to neighboring cells until reaching the vascular system and colonizing distant susceptible tissues. The outcome of this systemic infection is the appearance of symptoms. The strength and properties of symptoms can vary widely. Even for a given pair of plant and virus species, symptoms will depend upon specific combinations of plant and virus genotypes and, of course, on environmental conditions.

Much effort has gone into identifying individual cellular traits that may change their pattern of gene expression as a direct or indirect consequence of viral infection [1]. Identifying just one of such genes was a time-consuming task. However, with the advent of DNA microarray technologies, it has now become feasible to comprehensively examine gene expression networks during plant defense response triggered by infection with viral pathogens [2-4]. Just to mention a few examples, the alterations in *Arabidopsis thaliana* gene expression profile has been analyzed in plants infected with *Tobacco mosaic virus* (TMV) [5], *Cucumber mosaic virus* [6,7], and *Turnip mosaic virus* [8]. Genes showing significant alterations in expression profiles include transcription factors, heat-shock proteins (HSP), defense-regulated genes, phytohormone biosynthesis and signaling, kinases and phosphatases, antioxidants, many different metabolic enzymes, proteases and other genes involved in protein turnover, and genes relevant for chloroplast functions among many others (reviewed in [4]).

Here we explore the altered expression profile in systemically infected leaves of *A. thaliana* ecotype *Ler* infected with *Tobacco etch virus* (TEV). TEV is the type member of the *Potyvirus* genus of the *Potyviridae* family and its genome is composed by a 9.5 kb positive polarity single-stranded RNA that encodes a large ORF whose translation generates a polyprotein that is subsequently self-processed by virus-encoded proteases into 10 mature peptides [9,10]. TEV has a moderately wide host range infecting 149 species from 19 families [11], although most of its natural hosts belong to the family *Solanaceae*. In these

plants TEV induces stunting and mottling, necrotic etching and malformation in leaves [11]. *A. thaliana* ecotypes vary in their susceptibility to TEV. Some ecotypes (e.g., C24 and *Ler*) are fully susceptible [12,13] whereas many other (e.g., Col-0 and Ws-2) do not allow for systemic movement but support replication and cell-to-cell spread in inoculated leaves [12,13]. The particular ecotype used in this study, *Ler*, shows mild symptoms associated with a low viral titer. Microarray results identified sets of genes whose expression patterns show significant alterations in TEV inoculated plants. The classification of these genes into functional categories and their putative role in disease progress will be discussed. Finally, the overlapping between these functional categories and metabolic pathways is also explored and we found that hub pathways from central metabolism are involved in several functional responses.

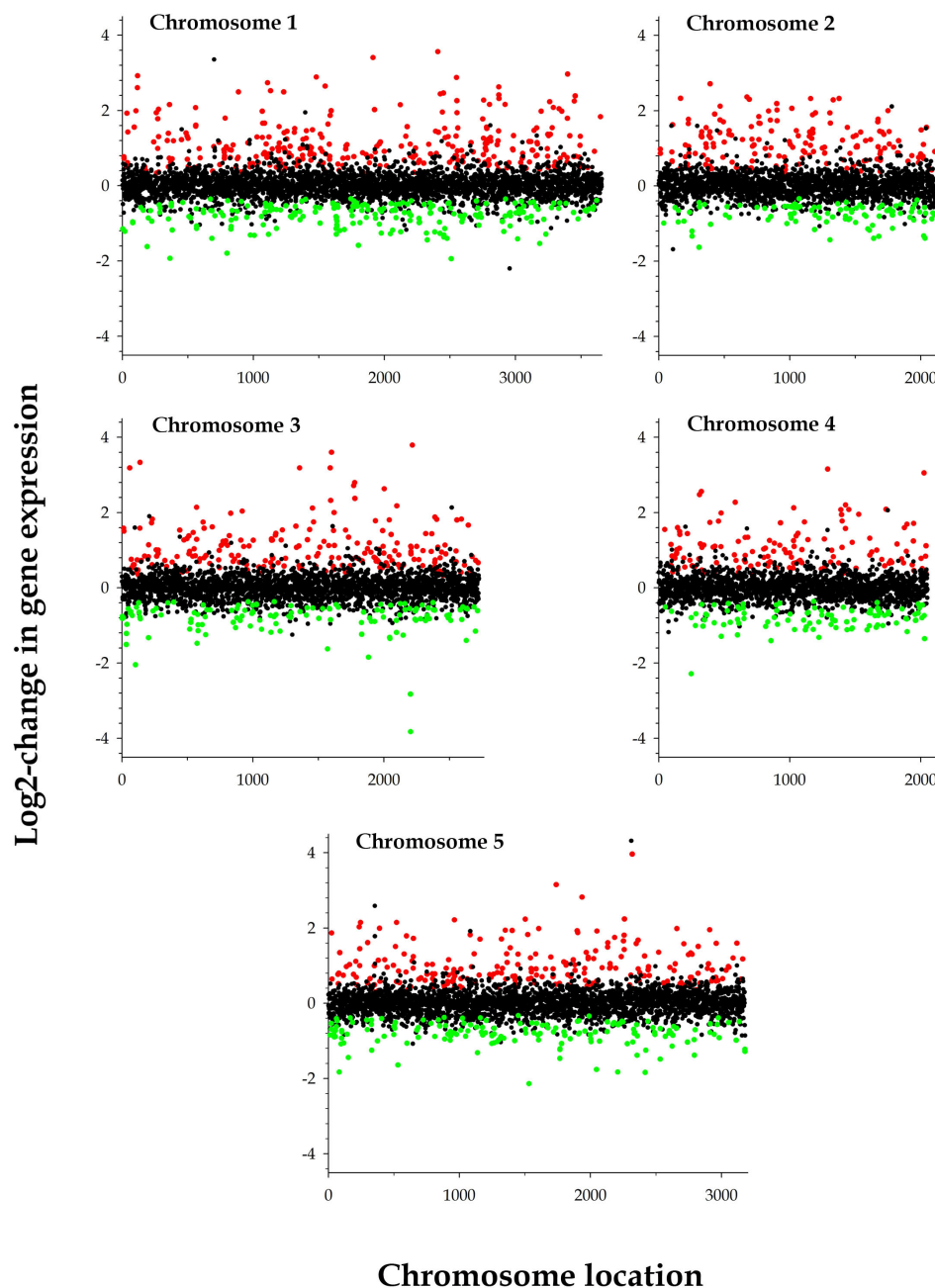
## Results

### Differences in transcriptional profiles

As a preliminary analysis, we were interested in knowing whether the overall pattern of gene expression was significantly affected by TEV infection. To do so, an ANOVA model in which gene (the 13,722 valid genes in the dataset) and treatment (mock-inoculated versus infected) were treated as orthogonal fixed factors was fitted to the expression data. No overall difference existed among genes ( $P = 0.139$ ), although infection significantly affected the levels of gene expression ( $P < 0.001$ ). More interestingly for the purpose of this article, a significant gene-by-treatment interaction was detected ( $P = 0.012$ ), suggesting that genes, on average, expressed differentially among non-infected and infected plants. Next, we used the SAM package [14], with a 5% false discovery rate (FDR) to identify individual genes whose expression was altered after the infection with TEV. A total of 1727 genes showed a significant alteration in their level of expression in infected plants. Indeed, significantly more genes were over- than under-expressed (1027 vs 700; Binomial test,  $P < 0.001$ ). Figure 1 shows the distribution of the fold-change in gene expression along the five *A. thaliana* chromosomes. Overall, no differences existed among chromosomes in the distribution of up-regulated, non-affected and down-regulated genes upon infection with TEV (homogeneity test,  $\chi^2 = 14.44$ , 8 d.f.,  $P = 0.071$ ), suggesting that genes involved in response to TEV infection were not clustered but randomly distribute among the five chromosomes.

### Functional categorization of genes over-expressed in TEV infected plants

Next we sought to explore which functional categories were affected by TEV infection. To this end gene ontology (GO) enrichment analyses were performed using the FatiGO tool [15]. Table 1 shows the non-redundant func-

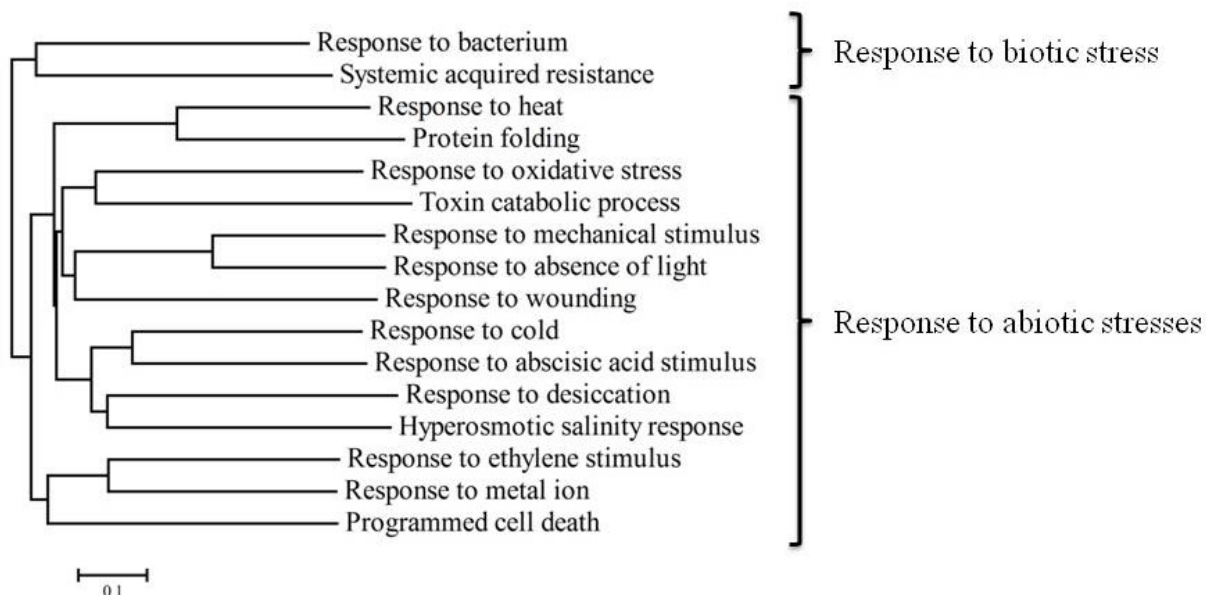
**Figure 1**

**Distribution of functional responses to TEV infection along the five chromosomes of *A. thaliana*.** Red and green dots correspond, respectively, to genes that were significantly over- or under-expressed in infected plants relative to mock-inoculated plants; black dots correspond to genes whose expression level was not affected by TEV infection. Each dot represents the median value of five independent microarray experiments.

tional categories significantly over- and under-represented among those genes that were significantly up-regulated upon TEV infection. A total of 16 non-redundant categories were over-represented, among these, genes related to cold response were the most abundant (25) whereas genes related to the absence of light were the less common (3). Nonetheless, different GO categories were not mutually exclusive and the same gene can be found in many different categories, according to its GO annotation. Given this non-independence among non-redundant GO categories, we can use the number of shared genes among every pair of GO categories to compute a similarity matrix [the  $(i, j)$  element of the matrix was computed according to  $S_{ij} = 2n_{ij}/(n_i + n_j)$ , where  $n_i$  and  $n_j$  were the genes belonging to categories  $i$  and  $j$  and  $n_{ij}$  the number of genes shared among both categories] that will allow constructing a neighbor-joining tree. This tree classifies GO categories according to their interdependence. Figure 2 shows the dendrogram obtained for the over-represented categories in Table 1. Biotic and abiotic responses were clearly separated into two clusters.

Regarding the large cluster containing abiotic responses, eight genes were shared by the response to heat and protein folding categories. A detailed exploration of these shared genes shows that five of them correspond to HSPs of the HSP70 (*At3g12580*, *At5g02490*, and *At3g09440*) and HSP90 (*At5g56010* and *At5g56030*) gene families,

both with activity as chaperones, one was a mitochondrial encoded chaperone (*At1g14980*), and two were luminal binding proteins (BiP) (*At5g42020* and *At5g28540*) also characterized as chaperones [16]. Eight up-regulated genes were common to response to cold and to abscisic acid (ABA) stimulus; this was not surprising given the well established role of ABA in plant acclimation to low temperatures [17]. Furthermore, one of these shared genes, *At5g52310*, also appeared within the categories of responses to desiccation and hyperosmotic salinity. Another gene that promiscuously appears under different up-regulated GO categories was *At5g37770* that encodes a protein with 40% similarity to calmodulin (CaM). This protein is involved in responses to mechanical stimulus, absence of light, cold, desiccation, hyperosmotic salinity, and ABA [18]. ABA has been described to affect the expression of CaM, illustrating the close relationship between hormones and phosphorylation and activation of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent kinases [18]. Two genes were in common between response to oxidative stress and toxin catabolism. Both genes encode for glutathione transferases. *At1g78380* encodes GST8, ( $\tau$ GST gene family) whereas *At1g02930* encodes GSTF6 ( $\phi$ GST gene family). GSTs are activated by several abiotic stresses and involved in herbicide detoxication [19]. Five up-regulated genes are shared between the ethylene stimulus response and response to metal ion categories. All these genes are members of the R2R3-MYB oncogene homologue family [20,21] also



**Figure 2**  
Neighbor-joining dendrogram illustrating the relationship among over-represented non-redundant GO categories obtained for genes that were up-regulated by TEV infection.

**Table 1: Gene ontology analyses of up-regulated genes**

Non-redundant GO categories	Level	Differentially expressed (%)	Total genes in the class (%)	P
<b>Over-represented</b>				
Response to mechanical stimulus	4	1.07 (5)	0.03	$6.36 \times 10^{-4}$
Response to wounding	4	2.99 (14)	0.78	$1.17 \times 10^{-7}$
Response to abscisic acid stimulus	5	5.59 (24)	1.72	$1.76 \times 10^{-4}$
Response to bacterium	5	3.73 (16)	0.77	$1.31 \times 10^{-4}$
Response to cold	5	5.83 (25)	1.34	$1.34 \times 10^{-6}$
Response to ethylene stimulus	5	4.43 (19)	1.17	$2.84 \times 10^{-4}$
Response to heat	5	4.90 (21)	0.78	$1.17 \times 10^{-7}$
Response to metal ion	5	2.56 (11)	0.63	$1.13 \times 10^{-2}$
Response to oxidative stress	5	4.20 (18)	1.60	$1.77 \times 10^{-2}$
Hyperosmotic salinity response	6	1.81 (6)	0.27	$2.79 \times 10^{-2}$
Protein folding	6	6.04 (20)	2.36	$1.16 \times 10^{-2}$
Response to desiccation	6	1.51 (5)	0.1	$5.98 \times 10^{-3}$
Toxin catabolic process	6	2.42 (8)	0.24	$1.14 \times 10^{-2}$
Programmed cell death	7	3.61 (9)	0.76	$1.33 \times 10^{-2}$
Response to absence of light	7	1.20 (3)	0.03	$2.75 \times 10^{-2}$
Systemic Acquired Resistance	8	4.67 (7)	0.42	$1.04 \times 10^{-3}$
<b>Under-represented</b>				
Organelle organization and biogenesis	4	1.07 (5)	5.19	$3.42 \times 10^{-4}$
DNA metabolic process	5	0.70 (3)	3.56	$1.62 \times 10^{-2}$

Non-redundant GO categories identified as enriched among up-regulated genes in infected plants versus mock-inoculated plants. The percentages of genes belonging to each category are reported for the differentially expressed genes and for the *A. thaliana* genes present in the microarray. The absolute number of genes is reported in parenthesis for the differentially expressed set. P: FDR-corrected P-value for the Fisher's exact test in a  $2 \times 2$  contingency table.

involved in the regulation of cell cycle, control of many aspects of plant secondary metabolism, and hypersensitive response cell death. Indeed, *At3g28910* (*MYB30*) was also shared with the programmed cell death category.

Regarding the small cluster of up-regulated genes assigned to biotic stress categories, two genes, *At3g54230* and *At1g74710*, were in the root of the cluster. The first gene encodes phytoalexin deficient 4 (*PAD4*), a lipase-like protein, involved in salicylic acid (SA) signaling and functions in gene-mediated and basal resistance. *PAD4* interacts directly with other disease-resistance signaling proteins, like the enhanced disease susceptibility 1 protein (*EDS1*) [22]. Both proteins are recruited by Toll-interleukin-1 receptor (TIR)-type nucleotide binding-leucine rich repeat (NB-LRR) proteins to signal isolate-specific pathogen recognition [22,23]. The second gene encodes a protein with isochorismate synthase activity that is involved in SA biosynthesis [24].

Table 1 also contains two GO categories of under-represented genes. Five genes were related to organelle organization and biogenesis and three with DNA metabolism. A single gene was common to these categories, *At5g64630*, that encodes for the p60 subunit of the chromatin assembly factor 1 (*CAF1*) and is involved in the organization of shoot and root apical meristems and production of viable gametes [25].

#### **Functional categorization of genes under-expressed in TEV infected plants**

Sixteen non-redundant functional categories of down-regulated genes were over-represented in TEV infected plants; none was under-represented (Table 2). The most abundant category was constituted by genes involved in response to auxin stimulus (25) whereas the less abundant one contained the two genes involved in NADH-dehydrogenase complex (plastoquinone) assembly (*At1g74880* and *At5g58260*). As in the previous case, we computed a neighbor-joining dendrogram relating these 16 non-redundant GO categories (Figure 3). Four categories did not share any gene with the other 12: chloroplast organization and biogenesis, vitamin E biosynthetic and tetraterpenoid metabolic processes, and NADH-dehydrogenase.

Nine genes were shared among the responses to SA, Cd<sup>2+</sup>, ethylene, jasmonic acid (JA) and salt stress. Eight of them appear annotated in databases as MYB transcription factors (*At3g47600*, *At2g46830*, *At1g22640*, *At1g01060*, *At3g09600*, *At1g71030*, *At5g02840*, and *At5g59780*), the ninth one (*At5g59430*) corresponds to the telomeric repeat-binding protein 1 (*TRP1*), which also contains the typical MYB motifs [26]. Eight out of these nine genes were also included in the response to auxin stimulus, being *At1g71030* (*MYBL2*) the missing one. *MYBL2* has two peculiarities, first it only contains one of the typical

two or three tryptophan repeats found in other MYB-like proteins and, second, it has a proline rich domain at the carboxi terminal end of the protein [27].

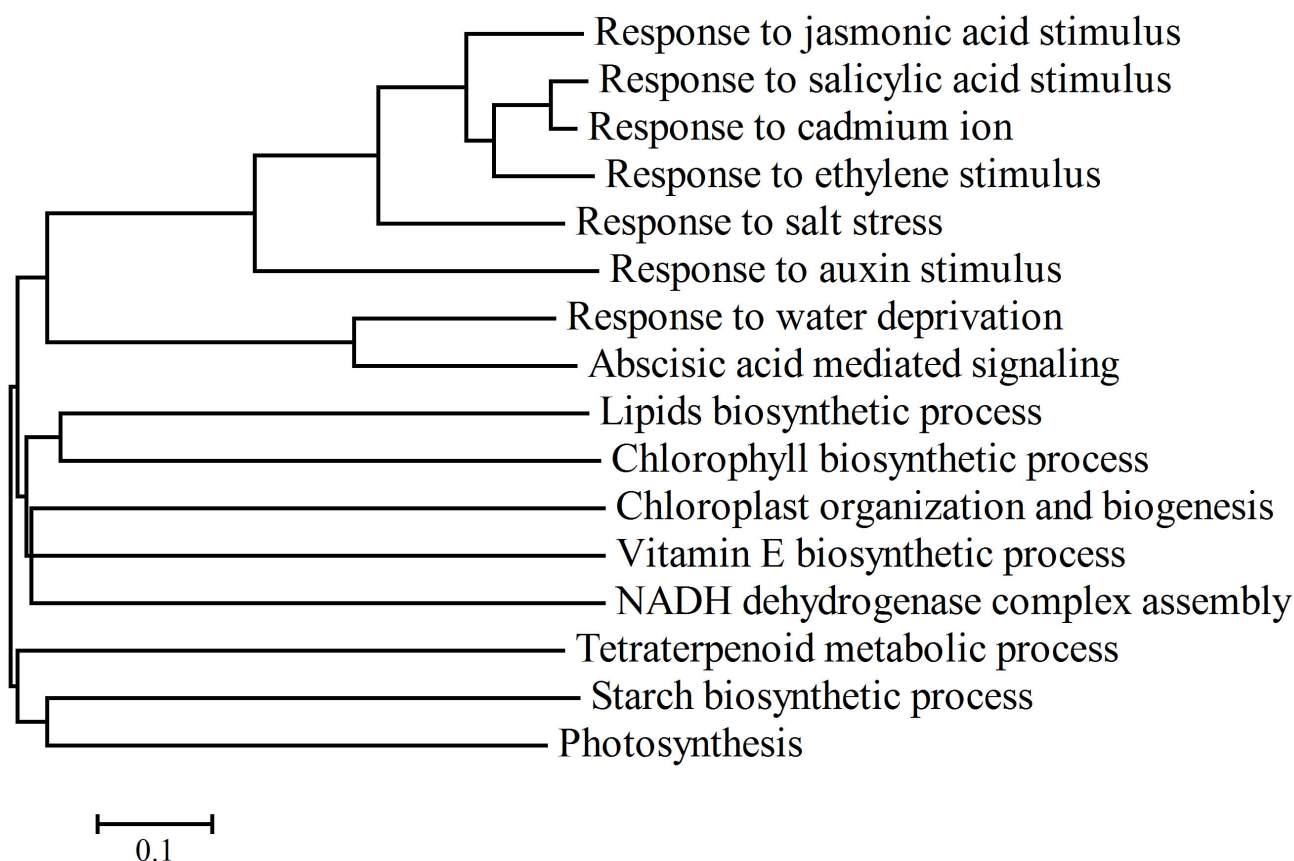
The functional categories of response to water deprivation and ABA-mediated signaling share six genes. Three of them were ABA-activated transcription factors (*At4g34000*, *At2g46680* and *At1g45249*), *At4g33950* is an ABA-activated protein kinase whose activity is triggered by osmotic stress, and the other two (*At3g11410* and *At5g57050*) encode protein phosphatases 2C, which are negative regulators of ABA signaling [28].

Lipid and chlorophyll biosynthetic processes shared a down-regulated gene, *At4g15560*. This gene encodes the chloroplasts alterados 1 protein (*CLA1*) that has 1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase activity required for the methylerythritol pathway, essential for chloroplast development in *Arabidopsis* [29].

Finally, photosynthesis and starch biosynthesis categories also shared a gene, *At3g55800*, that encodes for the chloroplastic sedoheptulose-1,7-biphosphatase (SBPase) involved in carbon reduction in the Calvin cycle [30]. Increases in SBPase expression have been associated to increases in photosynthetic activity and biomass production [30].

#### Metabolic pathways altered upon TEV infection

Next, we sought to explore metabolic pathways that were associated with the level-5 GO functional categories, some of which have been described in the previous section. To do so, a matrix  $\Omega$  was constructed quantifying the overlap between the 282 GO level-5 significant enriched functional categories and the 119 KEGG metabolic pathways. Each element in this matrix  $\omega_{ij}$  is the overlap score (defined in the Methods section) between the  $i$ th GO category and the  $j$ th metabolic pathway. A zero value means that not a single gene is present in both sets; the more overlap between both sets, the larger the index. The  $\Omega$  matrix is reported in Additional file 1. As a first prelimi-



**Figure 3**  
Neighbor-joining dendrogram illustrating the relationship among over-represented non-redundant GO categories obtained for genes that were down-regulated by TEV infection.

**Table 2: Gene ontology analyses of down-regulated genes**

Non-redundant GO categories	Level	Differentially expressed (%)	Total genes in the class (%)	P
<b>Over-represented</b>				
Photosynthesis	3	4.76 (16)	0.57	$5.99 \times 10^{-7}$
Response to jasmonic acid stimulus	4	3.79 (12)	0.98	$8.94 \times 10^{-3}$
Response to salicylic acid stimulus	4	3.15 (10)	0.89	$3.70 \times 10^{-2}$
Response to auxin stimulus	5	8.77 (25)	2.06	$2.14 \times 10^{-6}$
Response to salt stress	5	5.61 (16)	1.41	$7.85 \times 10^{-4}$
Response to water deprivation	5	4.21 (12)	0.87	$1.59 \times 10^{-3}$
Response to ethylene stimulus	5	4.21 (12)	1.23	$1.97 \times 10^{-2}$
Response to cadmium ion	6	3.95 (9)	0.44	$3.67 \times 10^{-4}$
Lipids biosynthetic processes	6	9.21 (21)	3.11	$1.59 \times 10^{-3}$
Chloroplast organization and biogenesis	6	2.63 (6)	0.36	$1.84 \times 10^{-2}$
Chlorophyll biosynthesis	7	4.52 (8)	0.20	$1.03 \times 10^{-5}$
Vitamin E biosynthesis	7	2.26 (4)	0.05	$1.72 \times 10^{-3}$
Abscicic acid mediated signaling	7	3.95 (7)	0.60	$1.13 \times 10^{-2}$
NADH dehydrogenase complex assembly	8	1.89 (2)	0.00	$3.70 \times 10^{-2}$
Starch biosynthetic processes	9	7.14 (4)	0.34	$1.12 \times 10^{-2}$
Tetraterpenoid metabolism	9	8.93 (5)	1.17	$3.79 \times 10^{-2}$

Non-redundant GO categories identified as enriched among up-regulated genes in infected plants versus mock-inoculated plants. The percentages of genes belonging to each category are reported for the differentially expressed genes and for the *A. thaliana* genes present in the microarray. The absolute number of genes is reported in parenthesis for the differentially expressed set. P: FDR-corrected P-value for the Fisher's exact test in a  $2 \times 2$  contingency table.

nary analysis, we studied which GO categories included more KEGG pathways. Columns in the matrix (i.e., KEGG pathways) were added up to compute a column vector of scores. The elements of the vector were then rank-ordered. The top 2.5% elements in this vector corresponded to the seven GO categories that overlapped the most with KEGG pathways. Not surprisingly, these GO categories contained KEGG metabolic pathways related with basal carbon metabolism. These functional categories were, sulfur compound biosynthesis, carbohydrate metabolism, carboxylic acid metabolism, carbohydrate catabolism, alcohol catabolism, response to oxidative stress, and energy derivation by oxidation of organic compounds (Additional file 1). The first three categories were over-represented whereas the remaining four were under-represented.

Focusing in GO functional categories related to biotic stress, the innate immune response, which was an over-represented category, was ranked 213/282 and it was related to 16 KEGG metabolic pathways (Additional file 1). Most of these pathways correspond to amino acid synthesis (K, W, G, S, V, and L) or secondary metabolism (e.g., methane metabolism, phenylpropanoid biosynthesis, ether lipid metabolism, benzoate degradation, and fatty acid metabolism). The response to bacterium, an under-represented category, was ranked 226/282 and overlapped with 14 KEGG pathways, including again amino acid metabolism, secondary metabolism (methane metabolism, phenylpropanoid biosynthesis, ether lipid metabolism, benzoate degradation), nitrogen metabo-

lism, oxidative phosphorylation and nicotinate and nicotinamide metabolism.

Focusing now on non-biotic stresses, the response to heat over-represented category was ranked 170/282 and overlapped with five KEGG pathways: glycolysis and gluconeogenesis, fructose and mannose metabolism, carotenoid biosynthesis, ascorbate and aldarate metabolism, and arginine and proline metabolism. Response to ABA ranked 214/282 and overlapped with 16 KEGG pathways. These pathways were diverse and ranged from central metabolism (glycolysis), secondary metabolism (pyruvate and sulfur metabolism), to detoxification pathways (e.g.,  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane, naphthalene and anthracene degradations). The response to ethylene stimulus ranked 144/282 and overlapped with only five KEGG pathways: aminosugars metabolism, methane metabolism, phenylpropanoid metabolism and amino acid (F, Y, and W) metabolism.

## Discussion

Viruses alter the transcriptional networks of their host cells. Some of these alterations may directly have an impact in the virus' replication, cell to cell and systemic spreads, and accumulation while others may simply be side-effects of virus replication. Similarly, many of these alterations may be related with disease development. Therefore, identifying which genes change their expression as a consequence of virus infection provides invaluable information to identify the host processes involved in virus replication. Here we have used DNA microarrays to



investigate the effect of TEV, a model system among the postyviruses, on the transcriptome of the susceptible host *A. thaliana* ecotype Ler [12,13]. This approach has allowed us to simultaneously analyze the response of 28,964 protein-coding gene transcripts and 87 miRNAs to TEV infection. The 1027 genes identified as up-regulated by TEV infection and the 700 genes identified as down-regulated by TEV infection provide candidate genes for further investigation of the interaction of this important virus and their hosts.

#### **Alterations in primary metabolism and cell cycle**

Genes involved with chloroplast biogenesis and activity were under-represented among the over-expressed genes. This list includes genes involved in chlorophyll biosynthesis and carbon fixation, suggesting a possible reason for the appearance of chlorosis and stunting in the TEV-infected *A. thaliana* plants.

Genes involved in DNA metabolism were also under-represented among genes over-expressed in infected plants. *At3g19150*, corresponds to the Kip-related protein gene (KRP) that encodes a cyclin-dependent kinase inhibitor which acts as negative regulator of cell division. Thus, under-expressing this gene may speed up cell division. The second gene, *At5g04560*, encodes the DME DNA glycosylase that activates the maternal *MEA* allele in the endosperm. The third gene, *At5g64630*, encodes for the p60 subunit of the *CAF1* factor that is required for cell differentiation. Thus, all in all, under-expression of these genes may affect cell division and differentiation.

#### **Alteration in antiviral responses**

Many genes over-expressed by TEV infection were stress- and defense-related genes. One of these over-expressed genes was *PAD4*, which is involved in signaling during plant defense responses. This gene was also shown to be over-expressed after infection of *A. thaliana* with several other viruses, including cucumoviruses, potexviruses, potyviruses, and tobamoviruses [3], suggesting that it may be a general response to virus infection rather than a TEV specific response. *PAD4* (along with many other genes, e.g., *BG2*, *PR1*, *PR5*, and *PAD3*) is controlled through signaling pathways that involve SA. We found the SA pathway being one of the most altered GO category after TEV infection, with certain genes being over-represented among the altered GO categories and some under-represented.

R2R3-MYB constitutes the largest MYB gene family in plants [21]. These transcription factors participate in many different cellular processes, from the regulation of secondary metabolism, to control of development and to determination of cell fate and identity. Interestingly, accumulated evidences suggest that they are often involved in combinatorial interactions with other transcription fac-

tors for the generation of highly specific expression patterns [21]. They are also involved in plant response to environmental stresses and their expression is strongly correlated with cell death during the hypersensitive response to pathogen attack, including the hypersensitive response for which they act as positive regulators [31]. Upon TEV infection, the response of MYB genes was quite variable, and ranged from under-expression of *TRP1* and *MYBL2* genes (involved in SA- and JA-mediated responses to pathogens) to over-expression of genes involved in ethylene stimulus response and response to metal ion categories.

One of the more interesting responses to TEV infection was the over-expression of genes related to protein-folding and thermal stress. HSPs are well known to be over-expressed after viral infection either as part of a more general stress response or actively induced by the virus in its own benefit. Supporting the first possibility, Jockush *et al.* [32] reported that tobacco plants expressing mutant TMV coat proteins triggered the over-expression of HSP as a consequence of the presence of large amounts of denatured proteins in the cytoplasm. Alternatively, viruses may elicit HSP expression via specific mechanisms. The over-expression of HSP has been frequently observed in response to both plant and animal viruses [33,34] suggesting that these proteins may be required for virus replication or used as an extrinsic buffering mechanism to cope with the high mutational load produced during virus low-fidelity RNA virus replication [35].

For example, *HSP101* enhances the translation of mRNAs in yeast and has been speculated that could also be a factor involved in tobamovirus replication [3]. In summary, our results add extra support to the view that HSP over-expression is an unspecific response to viral infection and not a particular feature of TEV infection.

Adaptive responses to abiotic stresses were classically associated to ABA signaling; while SA-, JA- and ethylene-mediated responses played major roles in disease resistance. However, experimental data have shown that reduced ABA levels correlated with increased resistance to different pathogens likely by its interaction with ethylene and JA pathways [36]. Consistently with this observation, several ABA-activated transcription factors and an ABA-activated protein kinase have been down-regulated in plants infected with TEV.

It has been well established that symptoms in potyvirus-infected plants are associated with the RNA silencing suppressor activity of the HC-Pro protein that interferes with the endogenous miRNA functions, causes misregulation of the expression of several miRNA-regulated transcription factors and produce developmental defects [37].



However, none of the 87 miRNAs spotted in the chip showed significant alteration in concentration in infected plants, thus suggesting that this approach would not be suitable for identifying miRNA-regulated genes.

## Conclusion

The data presented in this study demonstrates the varied effects at the transcriptomic level of TEV infection on a susceptible host. The observed changes in gene expression of genes involved in biotic and abiotic stress responses may be either directly or indirectly responsible for the mild symptoms developed by infected plants. None of the observed alterations in *A. thaliana* gene expression can be specifically associated to TEV infection but, instead, represent general responses to stress-induced by virus infection. Nonetheless, this type of experiments specifically designed to characterize host responses to viral infection might contribute to elucidating the mechanisms underlying plant defense responses to virus infection.

## Methods

### Virus and plants

The infectious clone pTEV-7DA (GeneBank [DQ986288](#)) was kindly provided by Prof. J.C. Carrington (Oregon State University). This clone contains a full-length cDNA of TEV and a 44 nt long poly-T tail followed by a *Bgl*II restriction site cloned into the pGEM-4 vector downstream of the SP6 promoter. 5' capped infectious RNA was obtained upon transcription of *Bgl*II-digested pTEV-7DA using SP6 mMESSAGE mMACHINE kit (Ambion). All other basic procedures are described elsewhere [38]. Three weeks-old *A. thaliana* Ler plants were inoculated with 5 µg RNA. Afterwards, plants were maintained in the greenhouse at 25°C and 16 h light. Successful infections were confirmed by Western blot hybridization analysis 21 dpi using commercial antibodies anti-coat protein conjugated with horse-radish peroxidase (Agdia).

### RNA extraction and microarray hybridization

Total RNA was extracted from control (mock inoculated) and systemic infected plants, and used in an amplification reaction with the MessageAmp II aRNA Amplification kit (Ambion) following manufacturer's instructions.

Five replicates for each sample category were generated. RNAs from each individual sample were extracted and amplified. A global reference was generated by equimolarly mixing amplified RNAs from each of the 10 samples. Amplified RNA from each individual sample, plus the reference, were used for labeling. For each category, three samples were labeled with Cy5 and two with Cy3, and compared with the corresponding reversed-labeled reference sample. Long 70-mers oligonucleotide microarrays contain 29,110 probes from the Operon Arabidopsis Genome Oligo Set Version 3.0 (Operon). This oligo set

represents 26,173 protein-coding genes, 28,964 protein-coding gene transcripts and 87 miRNAs and is based on the ATH1 release 5.0 of the TIGR *Arabidopsis* genome annotation database <http://www.tigr.org/tdb/e2k1/ath1/> and release 4.0 of the miRNA Registry at the Sanger Institute <http://www.sanger.ac.uk/Software/Rfam/mirna/index.shtml>. Oligos were rehydrated and DNA was immobilized by UV irradiation. Slides were then washed twice in 0.1% SDS, 4 times in water, and then dipped in 96% ethanol for 1 min and dried by centrifugation. Slides were prehybridized 30 min at 42°C with 100 µL of 6 × SSC, 1% BSA and 0.5% SDS, under a 60 × 22 mm coverslip Lifter-Slip (Erie Scientific) in an ArrayIt microarray hybridization cassette (TeleChem). Slides were then rinsed five times in H<sub>2</sub>O and dried by centrifugation. Slides were hybridized immediately. Labeled RNA was used to hybridize the slides basically as described in [39]. After hybridization and wash, slides were scanned at 532 nm for the Cy3 and 635 nm for the Cy5 dyes, with a GenePix 4000B scanner (Axon Molecular Devices), at 10 nm resolution and 100% laser power. Photomultiplier tube voltages were adjusted to equal the overall signal intensity for each channel, to increase signal-to-noise ratio, and to reduce number of spots with saturated pixels. Spot intensities were quantified using GenePix Pro 6.0 (Axon Molecular Devices).

### Microarray data analysis

Spots with a net intensity in both channels lower than the median signal plus twice standard deviations were removed as low signal spots. Data were normalized by median global intensity and with LOWESS correction [40] using the Acuity 4.0 software (Axon Molecular Devices). Finally, only probes for which a valid data was obtained in at least seven out of the ten slides were considered for further analysis (13,722 spots). Median, mean and SEM values were calculated from each treatment (control and TEV-infected plants), and all data were normalized to the median of the expression in control samples. To detect differentially expressed genes in plants infected with TEV compared to uninfected plants, data were analyzed with the SAM package [14], using a 5% FDR with no fold-change cut-off. Gene lists were further analyzed with FatiGO to find differential distributions of gene ontology (GO) terms between statistically differential genes and the rest of genes in the microarray (Fisher's exact test in 2 × 2 contingency tables), with *P* values adjusted after correcting for multiple testing [15]. Gene descriptions were downloaded from TAIR database <http://www.arabidopsis.org>.

The starting point for identifying under- and over-expressed metabolic pathways from gene expression data are the 119 *A. thaliana* pathways available in the January 2008 release of KEGG database <http://www.genome.jp/>

kegg[41]. These pathways contained, in average, eight enzyme-coding genes per pathway. The 284 groups of functionally equivalent genes (at level 5) identified by FatiGO contained each an average of 50 genes. Subsequently, every pathway and group were scored by computing the  $\log_2$  of the ratio between the gene expression level in TEV-infected plants and control plants (mock inoculated) and normalized by the number of genes in the set. To minimize the number of false positives, only the expression ratios under 0.7- or over 1.3-fold change were allowed to contribute to the scoring function. The pathways and GO groups with lower or higher scores were selected. To determine the statistical significance of these scores, sets of genes were randomly selected and their scores computed. For GO groups, the sets contained 50 genes, and for the KEGG pathways, the set contained an average of eight genes. Next, we defined the degree of overlapping between KEGG pathways and GO functional categories as the ratio between the intersection and the union of genes from presents in both sets. Finally, the statistical significance of this overlap statistic was assessed by bootstrapping the vector of values obtained for each GO functional category.

Microarrays were deposited at NCBI Gene Expression Omnibus database under accession number GSE11088.

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

### Authors' contributions

PAR and PdII did all the plant work. PAR and PC did the RNA extractions, labeling and microarray hybridizations. MAPA analyzed the microarray data and supervised microarray work. JC, GR and AJ developed the algorithm and analyzed the overlap between GO categories and KEGG pathways. SFE conceived and designed the experiments, analyzed the data and wrote the manuscript. All authors discussed the results and commented on the manuscript.

### Additional material

#### Additional file 1

Table s1. Supplemental table 1.

Click here for file

[http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1743-422X-5-92-S1.xls]

### Acknowledgements

We thank our labmates for help, comments, and fruitful discussion. This work has been supported by grants from the Spanish MEC-FEDER (BFU2006-14819-C02-01/BMC), the Generalitat Valenciana (ACOMP07/263), and the EMBO Young Investigator Program to S.F.E and the EU

BioModularH2 contract 043340 to A.J. P.A.R. and J.C. are recipients of graduate fellowships from the Spanish MEC and G.R. acknowledges a graduate fellowship from the Generalitat Valenciana.

### References

- Maule A, Leh V, Lederer C: **The dialogue between viruses and hosts in compatible interactions.** *Curr Op Plant Biol* 2002, **5**(4):279-284.
- Rowland O, Jones JDG: **Unraveling regulatory networks in plant defense using microarrays.** *Genome Biol* 2001, **2**:1001.1-1001.3.
- Whitham SA, Quan S, Chang HS, Cooper B, Estes B, Zhu T, Wang X, Hou YM: **Diverse RNA viruses elicit the expression of common sets of genes in susceptible *Arabidopsis thaliana* plants.** *Plant J* 2003, **33**:271-283.
- Whitham SA, Yang C, Goodin MM: **Global impact: elucidating plant responses to viral infection.** *Mol Plant-Microb Interact* 2006, **19**(11):1207-1215.
- Golem S, Culver JN: **Tobacco mosaic virus induced alterations in the gene expression profile of *Arabidopsis thaliana*.** *Mol Plant-Microb Interact* 2003, **16**(8):681-688.
- Ishihara T, Sakurai N, Sekine KT, Hase S, Ikegami M, Shibata D, Takahashi H: **Comparative analysis of expressed sequence tags in resistant and susceptible ecotypes of *Arabidopsis thaliana* infected with Cucumber mosaic virus.** *Plant Cell Physiol* 2004, **45**:470-480.
- Marathe R, Guan Z, Anandalakshmi R, Zhao H, Dinesh-Kumar SP: **Study of *Arabidopsis thaliana* resistome in response to Cucumber mosaic virus infection using whole genome microarray.** *Plant Mol Biol* 2004, **55**:501-520.
- Yang C, Guo R, Jie F, Nettleton D, Peng J, Carr T, Yeakley JM, Fan JB, Whitham SA: **Spatial analysis of *Arabidopsis thaliana* gene expression in response to Turnip mosaic virus infection.** *Mol Plant-Microb Interact* 2007, **20**(4):358-370.
- Urcuqui-Inchima S, Haenni AL, Bernardi F: **Potyvirus proteins: a wealth of functions.** *Virus Res* 2001, **74**:157-175.
- Adams MJ, Antoniw JF, Beaudoin F: **Overview and analysis of the polyprotein cleavage sites in the family Potyviridae.** *Mol Plant Pathol* 2005, **6**:471-487.
- Shukla DD, Ward CW, Brunt AA: *The Potyviridae* Wallingford, CAB International; 1994.
- Chisholm ST, Mahajan SK, Whitham SA, Yamamoto ML, Carrington JC: **Cloning of *Arabidopsis* RTM1 gene, which controls restriction of long-distance movement of Tobacco etch virus.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, **97**:489-494.
- Chisholm ST, Parra MA, Anderberg RJ, Carrington JC: **RTM1 and RTM2 genes function in phloem to restrict long-distance movement of Tobacco etch virus.** *Plant Physiol* 2001, **127**:1667-1675.
- Tusher VG, Tibshirani R, Chu G: **Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, **98**:5116-5121.
- Al-Shahrour F, Diaz-Uriarte R, Dopazo J: **Discovering molecular functions significantly related to phenotypes by combining gene expression data and biological information.** *Bioinformatics* 2005, **21**:2988-2993.
- Koizumi N: **Isolation and responses to stress of a gene that encodes a luminal binding protein in *Arabidopsis thaliana*.** *Plant Cell Physiol* 1996, **37**:862-865.
- Gusta LV, Trischuk R, Weiser CJ: **Plant cold acclimation: the role of abscisic acid.** *J Plant Growth Regul* 2005, **24**:308-318.
- Rakwal R, Komatsu S: **Absciscic acid promoted changes in the protein profiles of rice seedling by proteome analysis.** *Mol Biol Rep* 2005, **31**(4):217-230.
- Dixon DP, Lapthorn A, Edwards R: **Plant glutathione transferases.** *Genome Biol* 2002, **3**:reviews3004.
- Daniel X, Lacomme C, Morel JB, Roby D: **A novel myb oncogene homologue in *Arabidopsis thaliana* related to hypersensitive cell death.** *Plant J* 1999, **20**:57-66.
- Stracke R, Werber M, Weisshaar B: **The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*.** *Curr Opin Plant Biol* 2001, **4**:447-456.
- Wiermer M, Feys BJ, Parker JE: **Plant immunity: the EDS1 regulatory node.** *Curr Opin Plant Biol* 2005, **8**:383-389.
- Glazebrook J: **Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*.** *Curr Opin Plant Biol* 1999, **2**:280-286.

24. Wildermuth MC, Dewdney J, Wu G, Ausubel FM: **Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence.** *Nature* 2001, **414**:562-565.
25. Chen Z, Tan JL, Ingouff M, Sundaresan V, Berger F: **Chromatin assembly factor I regulates the cell cycle but not cell fate during male gametogenesis in *Arabidopsis thaliana*.** *Development* 2008, **135**:65-73.
26. Sue SC, Hsiao HH, Chung BC, Cheng YH, Hsueh KL, Chen CM, Ho CH, Huang TH: **Solution structure of the *Arabidopsis thaliana* telomeric repeat-binding protein DNA binding domain: a new fold with an additional C-terminal helix.** *J Mol Biol* 2006, **356**:72-85.
27. Kirik V, Bäumlein H: **A novel leaf-specific myb-related protein with a single binding repeat.** *Gene* 1996, **183**:109-113.
28. Hirayama T, Shinozaki K: **Perception and transduction of abscisic acid signals: keys to the function of the versatile plant hormone ABA.** *Trends Plant Sci* 2007, **12**:343-351.
29. Mandel MA, Feldmann KA, Herrera-Estrella L, Rocha-Sosa M, León P: **CLA1, a novel gene required for chloroplast development, is highly conserved in evolution.** *Plant J* 1996, **9**:649-658.
30. Tamoi M, Nagaoka M, Miyagawa Y, Shigeoka S: **Contribution of fructose-1,6-biphosphatase and sedoheptulose-1,7-biphosphatase to the photosynthetic rate and carbon flow in the Calvin cycle in transgenic plants.** *Plant Cell Physiol* 2006, **47**:380-390.
31. Vaillau F, Daniel X, Tronchet M, Montillet JL, Triantaphylidès C, Roby D: **R2R3-MYB gene, AtMYB30, A acts as a positive regulator of the hypersensitive cell death program in plants in response to pathogen attack.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, **99**:10179-10184.
32. Jockusch H, Wiegand C, Mersch B, Rajes D: **Mutants of Tobacco mosaic virus with temperature-sensitive coat proteins induce heat shock response in tobacco leaves.** *Mol Plant Microbe Interact* 2001, **14**:914-917.
33. Aranda MA, Escaler M, Wang D, Maule AJ: **Induction of HSP70 and polyubiquitin expression associated with plant virus replication.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, **93**:15289-15293.
34. Mayer MP: **Recruitment of Hsp70 chaperones: a crucial part of viral survival strategies.** *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2005, **153**:1-46.
35. Elena SF, Carrasco C, Daròs JA, Sanjuán R: **Mechanisms of genetic robustness in RNA viruses.** *EMBO Rep* 2006, **7**:168-173.
36. Mauch-Mani B, Much F: **The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions.** *Curr Op Plant Biol* 2005, **8**(4):409-414.
37. Kasschau DK, Xie Z, Allen E, Llave C, Chapman EJ, Krizan KA, Carrington JC: **PI/Hc-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA function.** *Dev Cell* 2003, **4**:205-217.
38. Carrasco P, Daròs JA, Agudelo-Romero P, Elena SF: **A real-time RT-PCR assay for quantifying the fitness of Tobacco etch virus in competition experiments.** *J Virol Methods* 2007, **139**(2):181-188.
39. Bueso E, Alejandro S, Carbonell P, Pérez-Amador MA, Fayos J, Bellés JM, Rodríguez PL, Serrano R: **The lithium tolerance of the *Arabidopsis cat2* mutant reveals a cross-talk between oxidative stress and ethylene.** *Plant J* 2007, **52**:1052-1065.
40. Yang YH, Dudoit S, Luu P, Lin DM, Peng V, Ngai J, Speed TP: **Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation.** *Nucl Acids Res* 2002, **30**:e15.
41. Kanehisa M, Araki M, Goto S, Hattori M, Hirakawa M, Itoh M, Katayama T, Kawashima S, Okuda S, Tokimatsu T, Yamanishi Y: **KEGG for linking genomes to life and the environment.** *Nucl Acids Res* 2008, **36**:D480-D484.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:  
[http://www.biomedcentral.com/info/publishing\\_adv.asp](http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp)





## PARTE II

---

Capítulo3. Adaptación del *Virus del grabado del tabaco* a *Arabidopsis thaliana* por manipulación de la expresión génica del huésped.



# Virus Adaptation by Manipulation of Host's Gene Expression

Patricia Agudelo-Romero, Pablo Carbonell, Miguel A. Perez-Amador, Santiago F. Elena\*

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-UPV, València, Spain

## Abstract

Viruses adapt to their hosts by evading defense mechanisms and taking over cellular metabolism for their own benefit. Alterations in cell metabolism as well as side-effects of antiviral responses contribute to symptoms development and virulence. Sometimes, a virus may spill over from its usual host species into a novel one, where usually will fail to successfully infect and further transmit to new host. However, in some cases, the virus transmits and persists after fixing beneficial mutations that allow for a better exploitation of the new host. This situation would represent a case for a new emerging virus. Here we report results from an evolution experiment in which a plant virus was allowed to infect and evolve on a naïve host. After 17 serial passages, the viral genome has accumulated only five changes, three of which were non-synonymous. An amino acid substitution in the viral VPg protein was responsible for the appearance of symptoms, whereas one substitution in the viral P3 protein the epistatically contributed to exacerbate severity. DNA microarray analyses show that the evolved and ancestral viruses affect the global patterns of host gene expression in radically different ways. A major difference is that genes involved in stress and pathogen response are not activated upon infection with the evolved virus, suggesting that selection has favored viral strategies to escape from host defenses.

**Citation:** Agudelo-Romero P, Carbonell P, Perez-Amador MA, Elena SF (2008) Virus Adaptation by Manipulation of Host's Gene Expression. PLoS ONE 3(6): e2397. doi:10.1371/journal.pone.0002397

**Editor:** Maria G. Masucci, Karolinska Institutet, Sweden

**Received:** November 29, 2007; **Accepted:** May 5, 2008; **Published:** June 11, 2008

**Copyright:** © 2008 Agudelo-Romero et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by grants BFU2006-14819-C02-01/BMC (Spanish MEC-FEDER), ACOMP07/263 (Generalitat Valenciana), and the EMBO Young Investigator Program to SFE. PAR and PC received fellowships from the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: sfelena@ibmcp.upv.es

## Introduction

One of the first consequences of organisms' adaptation to new environments is the manipulation of resources [1–4]. In this sense, the interaction between intracellular parasites and their hosts represents a paradigm of resource manipulation. In general, a virulent relationship results in the alteration of many aspects of cellular metabolism and development, which are taken over in the parasite's own benefit [5–7]. Whether the relationship between a host and a parasite evolves towards a more or less virulent or benign situation depends on several genetic and ecological factors that may affect virus accumulation and transmission between hosts [5]. Of particular interest in the context of emerging infectious diseases is the characterization of changes in the pathogen's genome that are responsible for adaptation to a new host after spilling over from the original one and to understand how these changes may alter host's metabolic and regulatory interactions.

High-density DNA microarrays offer an unparalleled view of the transcriptional events that underlie the host response to pathogens, providing a quantitative description of the behavior of tens of thousands of genes. In recent years, microarrays have been widely used to analyze the alteration of gene expression in host cells after infection with both animal [e.g., 8–13] and plant [e.g., 14–18] viruses. However, a common drawback of these previous studies is that experiments were either done in cell cultures [8–13], which always represent an artificial and oversimplified environment, or using host-

virus pairs whose previous evolutionary history of association is unknown and the degree of impact of abiotic environmental factor uncontrolled [14,17]. Therefore, the relevance of these studies and, more importantly, their evolutionary implications for the problem of emergent infectious diseases, are rather limited. In the following, the results from an experiment simulating the emergence of a plant virus that crossed the species barrier and is horizontally spreading on a population of partially-susceptible hosts are reported. Evolutionary changes in viral genome and phenotypic properties and, more importantly, in the way it interacts with its host's transcriptome are the focus of the study.

The pathosystem *Tobacco etch potyvirus* (TEV)-*Arabidopsis thaliana* ecotype *Ler* has been chosen for the present study. TEV genome is composed of a 9.5 kb positive polarity single-strand RNA that encodes a large ORF whose translation generates a polyprotein that is subsequently self-processed by virus-encoded proteases into 10 mature peptides [19,20]. TEV has a moderately wide host range infecting around 149 species from 19 families [21], although most of its natural hosts belong to the family *Solanaceae*. In these plants TEV induces stunting and mottling, necrotic etching and malformation in leaves [21]. *A. thaliana* ecotypes vary in their susceptibility to TEV. Some ecotypes (e.g., C24 and *Ler*) are fully susceptible [22,23] whereas many other (e.g., Col-0 and Ws-2) do not allow for systemic movement but support replication and cell-to-cell spread in inoculated leaves [22,23]. *Arabidopsis* is a member of the family *Brassicaceae*, which belongs to a different order than the

*Solanaceae* within the class *Magnoliopsida* [24]. Therefore, adaptation of TEV to *A. thaliana* represents a jump in host species at the taxonomic level of orders.

## Results and Discussion

### TEV adaptation to *A. thaliana*: phenotypic changes

The ancestral TEV was poorly adapted to *A. thaliana* *Ler* and infection concurred with the development of very mild symptoms (Figure 1). Furthermore, 21 days post-inoculation (dpi), the viral load in infected plants, measured as the number of lesion-forming units (LFU) produced per milligram of tissue, was low,  $48.33 \pm 2.95$  LFU/mg ( $\pm$ SEM), and the infectivity of the newly produced viral particles (i.e., the efficiency of initiating a new infection using a normalized amount of viral particles) was as low as 17.95% [95% confidence interval (CI): 7.54–33.53%].

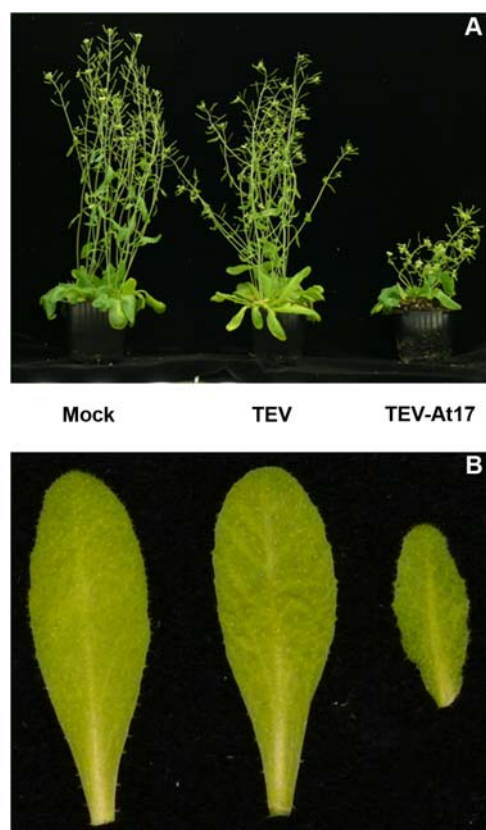
Viral particles obtained from a single tobacco plant were used to initiate an evolution experiment in *A. thaliana* *Ler* plants. Seven independent lineages were founded. Each lineage consisted on 10 plants. Twenty-one dpi, positive infections were confirmed by Western blot hybridization using an anti-coat protein antibody (data not shown). One of the infected plants from each lineage was randomly chosen to be the source of viral particles for infecting the next batch of plants. This basic transfer protocol was serially repeated every three weeks. In six out of seven cases, lineages went

to extinction as a consequence of decreases in viral loads beyond the threshold value that ensures efficient transmission. The only surviving lineage was maintained for 17 serial passages (hereafter TEV-At17). The viral load reached by TEV-At17 21 dpi, was  $2138.38 \pm 134.08$  LFU/mg. In other words, TEV-At17 accumulation was  $\sim 44$ -fold larger than the value estimated for the ancestral TEV (two-sample *t*-test,  $t_{43} = 15.58$ ,  $P < 0.0001$ ). Not only more viral particles were produced per gram of infected tissue, but also the infectivity of TEV-At17 was 100% (95% CI: 77.91–100%) and significantly larger than for the ancestral TEV (Binomial test, 1-tailed  $P < 0.0001$ ). Furthermore, symptoms induced by TEV-At17 were more severe (Figure 1), including stunting, vein clearing and leaf deformation.

### TEV adaptation to *A. thaliana*: genotypic changes

The above phenotypic changes have a correlate at the genetic level. Full-genome sequencing of TEV-At17 indicates that six changes have occurred during adaptation (first six rows in Table 1); three of them were non-synonymous. The first non-synonymous change, A1047V, affected the P3 protein. P3 localizes in nucleus and nucleoli in association with the NIa protein and participates in virus amplification through its interaction with the CI protein [20]. In other potyviruses, P3 is also involved in systemic movement [25,26]. The second mutation is a T1210M replacement in the 6K1 peptide. This short peptide has been implicated in plant pathogenicity since its deletion results in symptomless infections [20]. Finally, the third amino acid replacement observed is L2013F in the VPg domain of the NIa protein. VPg is covalently attached to the 5' end of the viral RNA and has essential functions in the viral replication and, relevant for the problem in hand, it has been reported as a key determinant in host-genotype specificity for systemic movement or replication [20] and it has been recently demonstrated that the proper interaction between the translation initiation factor eIF4B and VPg is necessary for TEV infection [27]. In conclusion, these three mutations may explain the observed improvement in virus amplification and pathogenicity. The relevance of the three synonymous substitutions observed is not as clear, although their adaptive value cannot be ruled out.

To further characterize the relationship between these changes and symptoms severity, we introduced them by site-directed mutagenesis in the ancestral TEV clone. In addition, all three possible pairs of non-synonymous mutations and the triple non-



**Figure 1. Symptoms developed 21 dpi by plants infected with ancestral and evolved TEV.** (A) A mock-inoculated plant is shown at the left. Plants inoculated with the ancestral virus (TEV) show milder symptoms than plants inoculated with the evolved virus (TEV-At17). (B) Details of a healthy leaf from control plants (Mock), a leaf infected with the ancestral virus showing light vein clearing (TEV), and a leaf infected with the evolved virus (TEV-At17) and showing vein clearing and deformation.

doi:10.1371/journal.pone.0002397.g001

**Table 1. Symptoms associated to the five mutations identified in the evolved virus TEV-At17.**

Nucleotide change	Protein and amino acid change	Symptoms severity
U537C	P1 synonymous	–
C3140U	P3 A1047V	–
C2518U	6K1 T1210M	–
C6037U	VPg L2013F	+
C6906U	NIa-Pro synonymous	–
	A1047V/T1210M	–
	A1047V/L2013F	+++
	T1210M/L2013F	+
	A1047V/T1210M/L2013F	+++

The three possible non-synonymous double mutants and the triple non-synonymous mutant were also constructed and their effect in symptoms development evaluated (Figure S1).

doi:10.1371/journal.pone.0002397.t001



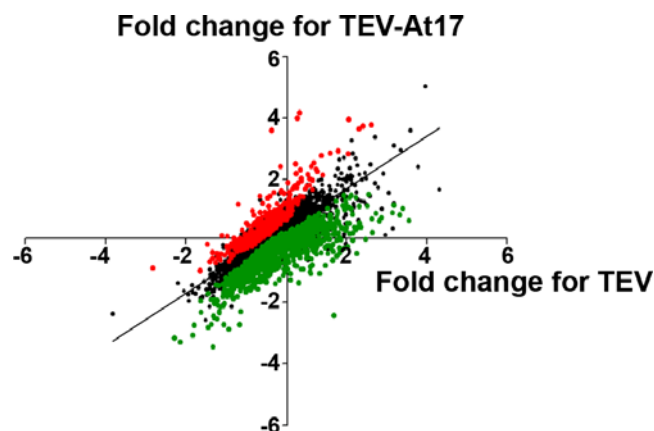
synonymous mutant were also created. *A. thaliana* Ler plants were inoculated with these nine mutant clones and maintained in the same growth conditions for three weeks. The results of this experiment are summarized in Table 1. All mutant genotypes were viable and replicated and accumulated in the plants, as confirmed by Western blot analysis (data not shown). Among the three single mutants, the only clone that produced visible symptoms was the one containing the L2013F allele in VPg. These symptoms were, nonetheless, qualitatively milder than those produced by TEV-At17 (Figure S1). Concerning the three double mutants, only the combination of VPg and P3 substitutions induced symptoms that were qualitatively more severe than those produced by the single VPg L2013F mutant (Table 1) and almost as severe as those observed for TEV-At17. By contrast, mutation 6K1 T1210M does not have any effect on aggravating the symptoms associated with VPg L2013F. The combination of substitutions in P3 and 6K1 did not produce any symptom. Finally, the triple mutant recreated the strong symptoms characteristic of TEV-At17 (Table 1 and Figure S1). All together, these results suggest that the presence of substitution L2013F in the VPg protein is enough for triggering symptoms and that the severity of these symptoms is enhanced by the presence of substitution A1047V in P3, suggesting an epistatic interaction between these two mutations. The role of substitution T1210M in the 6K1 peptide remains unclear.

It has been recently reported that the correct interaction between potyvirus VPg and host's eIF4E is required to initiate a successful infection [27]. Recessive resistance of peppers to potyvirus depends on the substitution of relevant amino acid residues in eIF4E that disrupt the normal interaction between this translation factor and VPg. Resistance-breaking viral strains restore the normal interaction [27]. Therefore, we can hypothesize that TEV-AT17 has enhanced its ability to infect *A. thaliana* Ler by improving the interaction of its VPg with the host's translation initiation factor eIF4E.

### Differential effect of evolved and ancestral viruses on the overall pattern of host gene expression

Next, we sought to unravel what component of the plant gene interaction networks and metabolic pathways have been targeted by the virus during its adaptation to *A. thaliana* Ler. Our goal is not to identify single genes but rather global transcriptomic changes. Long-oligonucleotide microarrays representing almost all genes in *A. thaliana* genome have been used to this end. Five replicates were analyzed per experimental treatment (control mock-inoculated plants, and plants infected with TEV and TEV-At17) using a global reference experimental design. After quality analysis, a total of 13,722 spots, corresponding to 12,180 genes, were considered as valid for further analyses (Table S1). Data were normalized to the median expression of non-infected plants, and thus they reflect biological differences in gene expression in each sample analyzed. Statistical analysis allowed identification of genes whose expression responded differentially upon infection with either TEV or TEV-At17 (Figure 2). When comparing global patterns of gene expression in plants infected with ancestral and adapted viruses, 496 genes showed higher expression and 1,322 genes lower expression in TEV-At17 infections than in TEV infections (Figure 2 and Tables S2 and S3); which represents 2.7 times more down-regulated than up-regulated genes (Binomial test,  $P < 0.0001$ ).

Differentially expressed genes were grouped according to self-organizing maps (SOM) (Figure 3 and Table S4). Three global patterns of gene expression were observed among genes that were up-regulated by TEV-At17 infection (Figure 3A). The first pattern

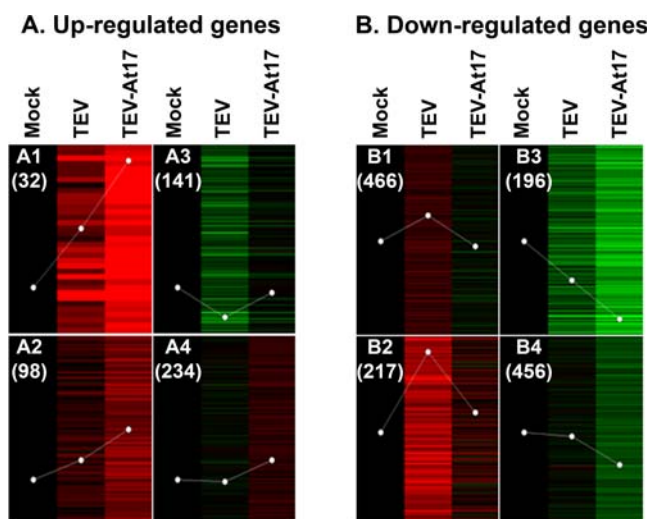


**Figure 2. Scatter plot of expression patterns of 12,120 genes between TEV- versus TEV-At17-infected plants.** Expression data were normalized by the median value obtained for the mock-inoculated plants. Green and red spots represent genes whose expression was significantly down- and up-regulated, respectively, in plants infected with TEV-At17 relative to those infected with the ancestral TEV virus. Black spots correspond to genes whose expression did not differentially respond to the infection of each viral genotype. doi:10.1371/journal.pone.0002397.g002

(SOMs A1 plus A2) corresponds to 130 genes whose expression was activated by both viruses but the magnitude of expression was magnified by TEV-At17. Genes belonging to this category include the pathogenesis-related protein *PR1*, which is well known to be a marker for the activation of salicylic acid-dependent defenses, such as the systemic acquired resistance (SAR) pathway [28,29]. The second pattern (SOM A3) corresponds with 141 genes that were down-regulated after infection with TEV but showed expression levels similar to uninfected plants when infected with TEV-At17. The third pattern (SOM A4) corresponds to 234 genes whose expression was not significantly affected by TEV infection but show increased expression after infection with TEV-At17.

Three distinct patterns were also observed among genes down-regulated after infection with TEV-At17 relative to the infection with TEV (Figure 3B). The first pattern (SOMs B1 plus B2) represents 683 genes that were over-expressed by plants infected with TEV but infection with TEV-At17 resulted in expression levels similar to those observed in uninfected plants. Interestingly, proteins related with disease response such as *PR5* and several other *PR*-like proteins as well as four proteins of the TIR-NBS-LRR class [29,30] belong to this category. The second pattern (SOM B3) includes 196 genes that were down-regulated after infection with both ancestral and evolved viruses, although the magnitude of down-regulation was larger for TEV-At17. Finally, the third pattern (SOM B4) corresponds to 456 genes whose expression was not affected by TEV but showed lower expression when TEV-At17 infected the plants.

The expression of transcription factors (TF) was also differentially affected by TEV and TEV-At17. Table S5 shows the list of differentially up- and down-regulated TF in plants infected with each type of virus. Fifty-one TFs, belonging to 20 families, were up-regulated whereas 84 TFs, from 27 families, were down-regulated, including 13 ethylene-responsive binding factors (ERF), after infection with TEV-At. ERFs are linked to stress responses [31] and delays in ERF induction had been described in *A. thaliana* plants infected with virulent strains of the bacteria *Pseudomonas syringae* when compared with avirulent strains of the same bacteria [31].



**Figure 3. Self-organization maps (SOMs) showing different patterns of gene expression.** Gene expression patterns for control (Mock), TEV-infected and TEV-At17-infected plants are organized into SOMs (labeled as 1 to 4 on panels A and B). The actual number of genes belonging to each SOM category is indicated below the corresponding label (in parenthesis). Green ranges are used to represent different levels of down-regulation relative to the control uninfected plants; red ranges are used to represent different magnitudes of up-regulation relative to uninfected plants. The brighter the color, the larger the difference in gene expression. (A) Plant genes whose expression is up-regulated upon infection with TEV-At17 compared with plants infected with the ancestral TEV. (B) Genes whose expression is down-regulated in plants infected with TEV-At17 compared with plants infected with the ancestral TEV.

doi:10.1371/journal.pone.0002397.g003

### Viral adaptation by avoidance of plant defenses

Next, we examined the distribution of genes involved in related biological processes that are differentially affected by TEV and TEV-At17 (i.e., gene ontologies (GO) categories [32]). The algorithm implemented in *FatiGO* [33] was applied to the non-redundant gene list grouped in each SOM (results are shown in Table S6). Only a significant differential category, response to salt stress, was identified for the SOM A3 of up-regulated genes shown in Figure 3A. By contrast, a large number of GO terms show significant over- and under-representation in the differentially down-regulated genes (Figure 3B). Table 2 shows the non-redundant functional categories that correspond to SOMs B1 plus B2 (i.e., genes over-expressed after infection by TEV but not differing from uninfected plants when infected with TEV-At17). Interestingly, significantly over-represented genes belong to functional categories which are related to plant responses to different abiotic (wounding, light intensity, temperature, salinity) and biotic stresses. Furthermore, genes involved in the SAR and in the activation of innate immune responses [29] were not expressed on plants infected with TEV-At17 while they were over-expressed on plants infected with the ancestral TEV, suggesting that the evolved virus acquired the ability to evade certain plant defense mechanisms, perhaps explaining the observed increase of viral load. Genes involved in basic cellular processes such as nucleic acid metabolism, translation and proteolysis were under-represented among down-regulated genes in SOMs B1 plus B2 (Table 2), suggesting that the plant may be compensating for the consumption of these resources by an increased viral replication.

A single significant GO category was also found in SOM B3 of down-regulated genes (Figure 3B), that is, gene expression was

repressed in presence of both viruses but to a larger extent when TEV-At17 was infecting plants. Genes involved in response to auxin were under-expressed to a larger extent by plants infected with TEV-At17 than with TEV.

### Concluding remarks

We have shown that adaptation of a virus to a new host occurs by few changes in viral genome. The increase in viral fitness correlates with deep changes in the patterns of host's gene expression, illustrating that the subtle but dynamic interplay between the pathogen and the plant shifts as the virus adapts to its host. Under the experimental conditions imposed, it may be speculated that natural selection may have favored viral genomes that avoided plant defense mechanisms as suggested by the observation of stress-related genes not being activated after infection with the evolved virus (Table 2). Therefore, perhaps as a consequence, increases in the strength of symptoms, virus accumulation and transmissibility have been observed. These phenotypic changes are associated to a few genomic changes fixed in the viral genome. In particular, the development of symptoms is associated to a single substitution in the viral VPg protein, whereas ulterior mutations in other viral components simply magnify symptoms. Our starting hypothesis was that viral adaptation occurs throughout the integration of viral replication processes within host physiology and circuitry of genetic and metabolic interactions. Necessarily, this integration has to affect the patterns of host's gene expression. Our experiments directly test this hypothesis, supporting its validity and, furthermore, pinpointing some physiological processes that may be targeted by the virus as it improves its fitness. The obvious follow-up of this study is to dissect the physiological processes and identify, whenever possible, the precise steps and proteins that are getting targeted by the virus during its adaptation.

Serial-passage experiments simulating horizontal transmission are well known to produce increases on parasite's virulence due to enhanced within-host competition among pathogenic strains, the decoupling between intra-host growth rate and transmission rate, and the lack of evolutionary innovation in the host [34]. The outcome of a different experimental design in which transmission would be vertical, and hence making high virulence detrimental, or in which virus and host are engaged in a coevolutionary arms-race may produce different results; perhaps with the evolution of a less severe virus and different alterations in plant gene expression.

Finally, the findings here reported call for extra precaution when analyzing data from microarray experiments seeking for the effect of pathogen's infection on host gene expression: the pathogen effect on host's transcriptomic profiles would depend on the degree of adaptation of the pathogen to the host and to environmental conditions. Therefore, the only fully meaningful studies would be those in which pathogens and their experimental hosts would have an evolutionary history of association in the experimental growth conditions, whereas results from studies in which hosts are infected with naïve pathogens or the effect of environmental variables on pathogen's growth remain uncontrolled would be of very limited interest.

### Materials and Methods

#### Virus and plants

An infectious clone pTEV-7DA [35] (GeneBank DQ986288), kindly provided by Prof. J.C. Carrington (Oregon State Univ.) was used as ancestor virus. This infectious clone contains a full-length cDNA of TEV and a 44 nt long poly-T tail followed by a *Bgl*II restriction site cloned into the pGEM-4 vector downstream of the

**Table 2.** Non-redundant GO categories differentially represented in SOMs B1 plus B2 of down-regulated genes

GO term	GO level	Differentially expressed (%)	Total genes in the class (%)	P
<b>Over represented</b>				
Response to wounding	4	4.26	0.76	<0.001
Response to hormone stimulus	4	9.09	4.85	0.048
Cell-to-cell signaling	4	1.42	0.19	0.050
Response to cold	5	4.82	1.43	0.008
Response to bacterium	5	3.54	0.82	0.009
Thigmotropism	5	0.64	0.00	0.048
Hyperosmotic salinity response	6	2.47	0.27	0.010
Protein modification process	6	24.69	15.02	0.010
Response to light intensity	6	2.06	0.27	0.047
Protein amino acid phosphorylation	7	26.56	14.38	0.002
MAPKKK cascade	7	1.56	0.07	0.047
Systemic acquired resistance	8	5.38	0.47	0.013
Activation of innate immune resistance	9	10.53	0.61	0.015
<b>Under represented</b>				
Nucleobase, nucleoside, nucleotide, and nucleic acid metabolic processes	4	13.64	22.54	0.004
Regulation of cellular processes	4	9.94	16.22	0.048
Proteolysis	6	2.06	7.98	0.011

doi:10.1371/journal.pone.0002397.t002

SP6 promoter. 5' capped infectious RNA was obtained upon transcription of *Bgl*II-digested pTEV-7DA using SP6 mMES-SAGE mMACHINE kit (Ambion). A stock of ancestral TEV viral particles was generated as follows. Five  $\mu$ g of RNA transcripts were rub-inoculated into the third true leaf of four-week old *Nicotiana tabacum* var Xanthi plants. Afterwards, plants were maintained in the green house at 25°C and 16 h light photoperiod. Seven dpi, virions were purified as described elsewhere [36], aliquoted and stored at -80°C.

The viral load reached by replicating TEV populations in *A. thaliana* was estimated by the dilution-inoculation assay method on the local-lesion host *Chenopodium quinoa* [37]. In short, 2 g of tissue was ground in 1 mL of 0.5 M phosphate buffer. Four different leaflets from each one of three different 4-week-old *C. quinoa* plants were rub-inoculated with 5  $\mu$ L of undiluted, 5- and 10-fold diluted virus, respectively; 100 mg/mL carborundum were added to facilitate inoculation. Nine dpi, the number of local lesions was recorded and transformed into viral infectious loads (LFU/mg) by estimating the intercept of the regression line of the observed number of lesions on the dilution factor.

*A. thaliana* Ler seeds were obtained from Lehle Seeds (cat. # WT-04 18 01).

### Experimental evolution protocol

Seven independent evolution lineages of TEV were maintained by serial passages until extinction or up to 17 passages. All evolving lineages were initiated from the ancestral TEV stock population. Therefore, initial viral genetic variation among inoculated *A. thaliana* plants was minimal. To maximize transmission success, 10 plants were inoculated per lineage. Plants were inoculated between growth stages 3.5 and 3.7 [38]. Plants were maintained at 25°C and 16 h light photoperiod. Successful infections were confirmed by Western blot hybridization analysis 21 dpi using commercial antibodies anti-coat protein conjugated with horseradish peroxi-

dase (Agdia). One gram of leaf tissue from a randomly-chosen infected plant per lineage were carefully ground in 1 mL 0.5 M phosphate buffer (pH = 8.0) and used to inoculate the next batch of 10 plants. Plants were always inoculated with similar viral doses.

### Genome sequencing

The consensus full-genome sequence of TEV-At17 was obtained following standard methods. In short, RNA was extracted using the RNeasy® Plant Mini kit (Quiagen), it was reverse-transcribed using MMuLV polymerase (Fermentas) and PCR amplified with *Taq* polymerase (Roche). The ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit 3.1 (Applied Biosystems) was used for cycle sequencing with fluorescently labeled dideoxynucleotides. Cycle sequencing reactions were carried out on a GeneAmp PCR System 9700 thermal cycler (Applied Biosystems). Labeled products were resolved in an ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Seven pairs of specific primers were used to amplify the 9.5 kb of TEV genome. The resulting fragments were overlapping, facilitating the task of fragment sequence assembly. Sequences were processed and analyzed with the STADEN 1.4b1. The 5'- and 3'-ends were sequenced by the RACE-PCR method [39].

### Site-directed mutagenesis

The seven mutant genotypes created in this study were generated by site-directed mutagenesis using the Quikchange® II XL kit (Stratagene) and following the indications of the manufacturer. Mutagenic primers were also designed according to Stratagene recommendations. To minimize unwanted errors during the mutagenesis process, the kit incorporates the *PfuUltra*™ high fidelity DNA polymerase. The presence of the desired mutation was confirmed by sequencing. To assess the presence of undesired mutations on each clone, the Surveyor™ Mutation Detection Kit Standard Gel Electrophoresis (Transgenomic) was

employed. All six mutant genotypes presented the expected genome-wide band pattern.

### RNA extraction and microarray hybridization

Total RNA was extracted from control and infected plants and used in an amplification reaction with the MessageAmp II aRNA Amplification kit (Ambion) following manufacturer's instructions.

Five replicates for each sample category were generated, and compared with a global reference, generated from an equimolar mix of amplified RNAs from each of the 15 plants. RNA from each individual sample, plus the reference, were amplified, and used for labeling. For each category, three samples were labeled with Cy5 and two with Cy3, and compared with the corresponding reversed-labeled reference mix. Long 70-mers oligonucleotide microarrays, provided by Dr. D. Galbraith (Univ. Arizona), contain 29,110 probes from the Qiagen-Operon *Arabidopsis* Genome Array Ready Oligo Set (AROS) Version 3.0. This oligo set represents 26,173 protein-coding genes, 28,964 protein-coding gene transcripts and 87 miRNAs and is based on the ATH1 release 5.0 of the TIGR *Arabidopsis* genome annotation database ([www.tigr.org/tdb/e2k1/ath1/](http://www.tigr.org/tdb/e2k1/ath1/)) and release 4.0 of the miRNA Registry at the Sanger Institute ([www.sanger.ac.uk/Software/Rfam/mirna/index.shtml](http://www.sanger.ac.uk/Software/Rfam/mirna/index.shtml)). Further information can be found at the Operon website ([omad.operon.com/download/index.php](http://omad.operon.com/download/index.php)). Oligos were rehydrated and immobilized by UV irradiation. Slides were then washed twice in 0.1% SDS, 4 times in water, dipped in 96% ethanol for 1 min, and dried by centrifugation. Slides were prehybridized 30 min at 42°C with 100 µL of 6× SSC, 1% BSA and 0.5% SDS, under a 60×22 mm coverslip LifterSlip (Erie Scientific) in an ArrayIt microarray hybridization cassette (TeleChem). Slides were then rinsed five times in H<sub>2</sub>O and dried by centrifugation. Slides were hybridized immediately. Labeled RNA was used to hybridize the slides basically as described in [40]. After hybridization and wash, slides were scanned at 532 nm for the Cy3 and 635 nm for the Cy5 dyes, with a GenePix 4000B scanner (Axon Molecular Devices), at 10 nm resolution and 100% laser power. Photomultiplier tube voltages were adjusted to equal the overall signal intensity for each channel, to increase signal-to-noise ratio, and to reduce number of spots with saturated pixels. Spot intensities were quantified using GenePix Pro 6.0 (Axon Molecular Devices).

Microarray raw data were deposited in the NCBI's GEO database under accession GSE11088.

### Microarray data analysis

Spots with a net intensity in both channels lower than the median signal background plus twice standard deviations were removed as low signal spots. Data were normalized by median global intensity and with LOWESS correction [41] using the Acuity 4.0 software (Axon Molecular Devices). Finally, only probes for which a valid data was obtained in at least 13 out of the 15 slides were considered for further analysis (13,722 spots; Table S1). Median, mean and standard deviations were calculated from each treatment (control, TEV- and TEV-At17-infected plants), and all data were normalized to the median of the expression in control samples. To detect differentially expressed genes in plants infected with TEV-At17 compared to TEV, data were analyzed with the SAM package [42], using two-class comparison (TEV versus TEV-At17) with a false discovery rate (FDR) of 5.38% with no fold-change cut-off. Differentially over- and under-expressed genes were grouped in 2×2 self-organizing maps (SOMs) [43] using Acuity with Euclidean squared similarity metrics. Gene lists were further analyzed with FatiGO [33] to find differential distributions of gene ontology (GO) terms between statistically differential genes

in each SOM and the rest of genes in the microarray, with *P* values adjusted after correcting for multiple testing [33]. SAM analysis at 1% FDR gave qualitatively identical results, confirming their robustness to changes in arbitrarily-chosen statistical thresholds.

### Supporting Information

**Figure S1** Representative plants showing the symptoms induced by several of the viral genotypes described in Table 1.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0002397.s001 (2.50 MB TIF)

**Table S1** Gene expression data from DNA microarray analysis. Mock, control non-infected plants; TEV, plants infected with the ancestral virus; TEV-At17, plants infected with the evolved virus. A total of 13,722 spots were considered to give high quality expression data. Median, mean and standard deviation were calculated for each group of samples and all data were normalized by the median expression in the control plants. Gene name and annotation are included.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0002397.s002 (9.36 MB XLS)

**Table S2** Significantly up-regulated genes between TEV- and TEV-At17-infected plants. Genes were ordered based on the score in SAM output with a FDR of 5.38% (533 spots, corresponding with 496 genes).

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0002397.s003 (0.49 MB XLS)

**Table S3** Significantly down-regulated genes between TEV- and TEV-At17-infected plants. Genes were ordered based on the score in SAM output with a FDR of 5.38% (1378 spots, corresponding with 1322 genes).

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0002397.s004 (1.12 MB XLS)

**Table S4** SOM clustering of significant genes, both up- and down-regulated, between TEV- and TEV-At17-infected plants. Genes belonging to each of the eight SOMs in Figure 3 are listed on different spreadsheets, along with their annotation and mean expression data in control and in TEV- and TEV-At17-infected plants.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0002397.s005 (0.48 MB XLS)

**Table S5** Transcription factors differentially expressed after infection with TEV and TEV-At17. *A. thaliana* transcription factors and other transcription regulators were mainly downloaded from [arabidopsis.med.ohio-state.edu/AtTFDB/index.jsp](http://arabidopsis.med.ohio-state.edu/AtTFDB/index.jsp), and collapsed with the significantly up-regulated (Table S2) and down-regulated (Table S3) genes between TEV- and TEV-At17-infected plants, to generate a list of differentially expressed transcription factors. Mean and standard deviations are indicated for control, TEV- and TEV-At17-infected plants.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0002397.s006 (0.08 MB XLS)

**Table S6** Differential GO categories among differential genes grouped by SOM. FatiGO analysis was carried out for each SOM in Figure 3. Differential categories were identified for down-regulated genes in SOMs B1 plus B2 and B3 (Figure 3B) and in up-regulated genes in SOM A3 (Figure 3A). List1 includes the differential genes (gene name, number and percentage) belonging to each GO category, while List2 include the rest of genes in the same GO category represented in the microarray. Unadjusted and adjusted *P* values after correcting for multiple-tests are also indicated.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0002397.s007 (0.07 MB XLS)

## Acknowledgments

We thank F. de la Iglesia for excellent technical support, P. Carrasco, M. A. Blázquez, J. A. Daròs, S. Martín, D. Molina, R. Sanjuán, and C.

## References

- Bohannon BJM, Lenski RE (2000) Linking genetic change to community evolution: insights from studies of bacteria and bacteriophage. *Ecol Lett* 3: 362–377.
- Chao L, Levin BR, Stewart FM (1977) A complex community in a simple habitat: an experimental study with bacteria and phage. *Ecology* 58: 369–378.
- Tilman D (1982) *Resources Competition and Community Structure*. Princeton: Princeton University Press.
- Rainey PB, Travisano M (1998) Adaptive radiation in a heterogeneous environment. *Nature* 394: 69–72.
- Bull JJ (1994) Virulence. *Evolution* 48: 1423–1437.
- Hiscox JA (2007) RNA viruses: hijacking the dynamic nucleolus. *Nat Rev Microbiol* 5: 119–127.
- Scaria V, Hariharan M, Maiti S, Pillai B, Brahmachari SK (2006) Host-virus interaction: a new role for microRNAs. *Retrovirology* 3: 68.
- Bosinger SE, Hosiawa KA, Cameron MJ, Persad D, Ran L, et al. (2004) Gene expression profiling of host response in models of acute HIV infection. *J Immunol* 173: 6858–6863.
- Grinde B, Gayorfar M, Hoddevik G (2007) Modulation of gene expression in a human cell line caused by poliovirus, vaccinia virus and interferon. *Virology* 35: 24.
- Leong WF, Tan HC, Ooi EE, Koh DR, Chow VT (2005) Microarray and real-time RT-PCR analyses of differential human gene expression patterns induced by severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus infection of Vero cells. *Microbes Infect* 7: 248–259.
- Martínez I, Lombardía L, García-Barreno B, Domínguez O, Melero JA (2007) Distinct gene subsets are induced at different time points after human respiratory syncytial virus infection of A549 cells. *J Gen Virol* 88: 570–581.
- Mossman KL, Macgregor PF, Rozmus JJ, Goryachev AB, Edwards AM, et al. (2001) Herpes simplex virus triggers and then disarms a host antiviral response. *J Virol* 75: 750–758.
- Rubins KH, Hensley LE, Jahrling PB, Whitney AR, Geisbert TW, et al. (2004) The host response to smallpox: analysis of the gene expression program in peripheral blood cells in a nonhuman primate model. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 15190–15195.
- Golem S, Culver JN (2003) *Tobacco mosaic virus* induced alterations in the gene expression profile of *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microb Interact* 16: 681–688.
- Ishihara T, Sakurai N, Sekine KT, Hase S, Ikegami M, et al. (2004) Comparative analysis of expressed sequence tags in resistant and susceptible ecotypes of *Arabidopsis thaliana* infected with *Cucumber mosaic virus*. *Plant Cell Physiol* 45: 470–480.
- Marathe R, Guan Z, Anandalakshmi R, Zhao H, Dinesh-Kumar SP (2004) Study of *Arabidopsis thaliana* resistome in response to *Cucumber mosaic virus* infection using whole genome microarray. *Plant Mol Biol* 55: 501–520.
- Senthil G, Liu H, Puram VG, Clark A, Stromberg A, et al. (2005) Specific and common changes in *Nicotiana benthamiana* gene expression in response to infection by enveloped viruses. *J Gen Virol* 86: 2615–2625.
- Yang C, Jie F, Nettleton D, Peng J, Carr T, et al. (2007) Spatial analysis of *Arabidopsis thaliana* gene expression in response to *Turnip mosaic virus* infection. *Mol Plant Microb Interact* 20: 358–370.
- Adams MJ, Antoniw JF, Beaudoin F (2005) Overview and analysis of the polyprotein cleavage sites in the family *Potyviridae*. *Mol Plant Pathol* 6: 471–487.
- Urcuqui-Inchima S, Haenni AL, Bernardi F (2001) *Potyvirus* proteins: a wealth of functions. *Virus Res* 74: 157–175.
- Shukla DD, Ward CW, Brunt AA (1994) *The Potyviridae*. Wallingford: CAB International.
- Chisholm ST, Mahajan SK, Whitham SA, Yamamoto ML, Carrington JC (2000) Cloning of *Arabidopsis RTM1* gene, which controls restriction of long-distance movement of *Tobacco etch virus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 489–494.
- Chisholm ST, Parra MA, Anderberg RJ, Carrington JC (2001) *RTM1* and *RTM2* genes function in phloem to restrict long-distance movement of *Tobacco etch virus*. *Plant Physiol* 127: 1667–1675.
- Soltis DE, Soltis PS, Chase MW, Mort ME, Albach DC, et al. (2000) Angiosperm phylogeny inferred from 18S rDNA, *rbcL* and *atpB* sequences. *Bot J Linn Soc* 133: 381–461.
- Choi IR, Horken KM, Stenger DC, French R (2005) An internal RNA element in the P3 cistron of *Wheat streak mosaic virus* revealed by synonymous mutations that affect both movement and replication. *J Gen Virol* 86: 2605–2614.
- Suchiro N, Natsuaki T, Watanabe T, Okuda S (2004) An important determinant of the ability of *Turnip mosaic virus* to infect *Brassica* spp. and/or *Raphanus sativus* is in its P3 protein. *J Gen Virol* 85: 2087–2098.
- Charron C, Nicolai M, Gallois JL, Robaglia C, Moury B, et al. (2008) Natural variation and functional analyses provide evidence for co-evolution between plant eIF4E and potyviral VPg. *Plant J* 54: 56–68.
- van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol* 44: 135–162.
- Jones JG, Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature* 444: 323–329.
- Meyers BC, Kozik A, Griego A, Kuang H, Michelmore RW (2003) Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15: 809–834.
- Oñate-Sánchez L, Singh KB (2007) Identification of *Arabidopsis* ethylene-responsive element binding factors with distinct induction kinetics after pathogen infection. *Plant Physiol* 128: 1313–1322.
- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, et al. (2000) Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nat Genet* 25: 25–29.
- Al-Shahrour F, Diaz-Uriarte R, Dopazo J (2005) Discovering molecular functions significantly related to phenotypes by combining gene expression data and biological information. *Bioinformatics* 21: 2988–2993.
- Ebert D (1998) Experimental evolution of parasites. *Science* 282: 1432–1435.
- Dolja VV, McBride HJ, Carrington JC (1992) Tagging of plant potyvirus replication and movement by insertion of  $\beta$ -glucuronidase into the viral polyprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 10208–10212.
- Carrasco P, Daròs JA, Agudelo-Romero P, Elena SF (2007) A real-time RT-PCR assay for quantifying the fitness of *Tobacco etch virus* in competition experiments. *J Virol Meth* 139: 181–188.
- Kleczkowski A (1950) Interpreting relationships between the concentrations of plant viruses and numbers of local lesions. *J Gen Microbiol* 4: 53–69.
- Boyes DC, Zayed AM, Ascenzi R, McCaskill AJ, Hoffman NE, Davies KR, Görlach J (2001) Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: a model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell* 13: 1499–1510.
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Bueso E, Alejandro S, Carbonell P, Perez-Amador MA, Fayos J, et al. (2007) The lithium tolerance of the *Arabidopsis CAT2* mutant reveals a cross-talk between oxidative stress and ethylene. *Plant J* 52: 1052–1065.
- Yang YH, Dudoit S, Luu P, Lin DM, Peng V, et al. (2002) Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucl Acids Res* 30: e15.
- Tusher VG, Tibshirani R, Chu G (2001) Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 5116–5121.
- Kohonen T (1990) The self-organizing map. *Proc IEEE* 78: 1464–1480.

Torres-Barceló for fruitful discussion or help, and D. Grubb for comments and English corrections.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SE. Performed the experiments: PA PC. Analyzed the data: SE MP. Wrote the paper: SE.



## PARTE II

---

Capítulo 4. Relación entre la adaptación del *Virus del grabado del tabaco* al ecotipo susceptible *Arabidopsis thaliana* Ler-0 y la infectividad en ecotipos no susceptibles.





# La adaptación del *Virus del grabado del tabaco* al ecotipo susceptible *Arabidopsis thaliana* Ler-0 aumenta su infectividad en otros ecotipos antes no susceptibles

Patricia Agudelo-Romero, Santiago F. Elena<sup>1</sup>

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-UPV, Campus UPV CPI 8E, Ingeniero Fausto Elio s/n, 46022 València, España

El movimiento sistémico del *Virus del grabado del tabaco* (TEV) en *Arabidopsis thaliana* viene determinado por la presencia de un alelo dominante en el gen *Restricción de Movimiento a TEV 1* (*RTM1*), habiéndose comprobado por otros autores (Carr y Whitham 2007) que distintos ecotipos de *A. thaliana* difieren en su susceptibilidad a la infección por este virus. En un trabajo previo, evolucionamos experimentalmente TEV mediante pases seriados en el ecotipo Ler-0, que posee el alelo de susceptibilidad *rtm1* (Chisholm *et al.*, 2000, 2001). El virus resultante de este experimento, TEV-At17 mostraba una virulencia y niveles de acumulación en Ler-0 significativamente mayores que el virus ancestral (Agudelo-Romero *et al.*, 2008). Tres mutaciones no sinónimas en otros tantos genes virales explicaban esta diferencia en infectividad (Agudelo-Romero *et al.*, 2008). En el presente trabajo hemos comprobado si la infectividad y virulencia de TEV-At17 es exclusiva del ecotipo Ler-0 o si, por el contrario, la adaptación a este ecotipo ha ampliado la gama de huéspedes de TEV a otros ecotipos de *A. thaliana*, incluyendo aquellos portadores del alelo de resistencia *RTM1*. Nueve ecotipos de *A. thaliana* fueron empleados para evaluar la frecuencia de infección, severidad y tipos de síntomas generados tras la inoculación con los genotipos ancestral y evolucionado de TEV. El genotipo ancestral de TEV solamente infectaba los ecotipos St-0, induciendo síntomas marcados, y Ler-0, con síntomas leves. Por el contrario, TEV-At17 infectó con eficiencia variable todos los ecotipos estudiados, incluyendo algunos portadores del alelo *RTM1*. Así mismo, la severidad de los síntomas inducidos en cada ecotipo también fue variable. Estos resultados cuestionan la validez del concepto de genes de resistencia y ponen de manifiesto que éste solamente tiene sentido para una combinación dada de genotipos virus-planta.

Las enfermedades emergentes o re-emergentes, especialmente las provocadas por virus de RNA, son un fenómeno con importantes implicaciones en salud pública, sanidad animal y agronomía (Antia *et al.*, 2003; Woolhouse *et al.*, 2005; Fargette *et al.*, 2006). Además de

por este interés sanitario, desde el punto de vista académico, los virus de RNA son también unas excelentes herramientas para abordar problemas básicos en biología evolutiva en un plazo de tiempo impensable con organismos superiores (Elena y Lenski 2003; Moya *et al.*, 2004). Los virus de RNA poseen características que les hacen inmejorables como modelos experimentales: altas tasas de mutación y replicación, grandes tamaños de población y genomas compactos fácilmente caracterizables (Elena y Sanjuán 2007). Además, los virus de RNA de plantas nos proporcionan una ventaja adicional: poder trabajar con huéspedes reales en gran número y sin problemas serios de bioseguridad ni de bioética (Whitham *et al.*, 2006).

El huésped es el factor principal que afecta a la evolución del virus. El grado en el que un virus se adapta a un huésped en particular dependerá del balance entre la selección dentro del huésped y el flujo de genes entre huéspedes (Agudelo-Romero y Elena 2008). En términos ecológicos los virus pueden comportarse como: (1) especialistas si tienen un nicho restringido a uno o pocos huéspedes (Fry 1996). (2) Generalistas si tienen una amplia gama de huéspedes potenciales a los que puede infectar y además ser transmitidos a través de estos (Woolhouse *et al.*, 2001). Un buen número de modelos teóricos han explorado las condiciones en las que un organismo puede evolucionar hacia el generalismo o el especialismo cuando se enfrenta a ambientes heterogéneos (Levins 1962, 1963), incluyendo modelos en los que el carácter analizado es la virulencia de los parásitos (Regoes *et al.*, 2000).

En el caso de los virus especialistas, la adaptación a un nuevo huésped viene acompañada de la pérdida de eficacia biológica en el huésped original (Turner y Elena 2000). Este compromiso adaptativo puede ser debido a dos mecanismos no necesariamente excluyentes. El primero de éstos es el antagonismo pleiotrópico, según el cual las mutaciones beneficiosas fijadas en el nuevo huésped serían deletéreas en el huésped original, promoviendo así la especialización (Novella *et al.*, 1995; Crill *et al.*, 2000; Remold *et al.*, 2008). El segundo mecanismo sería la acumulación de mutaciones neutrales bien por el barrido selectivo de alelos neutrales ligados a uno beneficioso o bien por la deriva genética; en cualquier caso, el resultado sería la acumulación de mutaciones neutrales en el nuevo huésped que tendrían un efecto deletéreo en el huésped original (Preslold *et al.*, 2008).

En un trabajo previo, Agudelo-Romero *et al.* (2008) adaptaron el *Potyvirus del grabado del tabaco* (TEV) al ecotipo Ler-0 de *Arabidopsis thaliana*. El virus resultante mostraba propiedades virológicas radicalmente distintas de las del virus ancestral: una alta infectividad, unos niveles de acumulación tres órdenes de magnitud superiores y causaba un síndrome severo consistente en enanismo, clorosis de venas y deformaciones de hojas, tallos y silicuas. El virus evolucionado, TEV-At17, solamente se distinguía genéticamente de su ancestro en cinco cambios nucleotídicos, dos de los cuales eran sinónimos. Un único reemplazamiento aminoacídico L2013F en el dominio VPg de la proteína NIa resultó ser suficiente para inducir el síndrome severo, mientras que los otros dos cambios de

<sup>1</sup> Author for correspondence: sfelena@ibmcp.upv.es

exacerbar la severidad de los síntomas (Agudelo-Romero *et al.*, 2008). Recientemente se ha demostrado que el inicio de la infección depende de la correcta interacción entre el factor de iniciación de la traducción eIF4E y la VPg de los potyvirus (Charron *et al.*, 2008). TEV se caracteriza por tener un genoma de cadena sencilla de RNA y polaridad positiva de 9.5 kb que contiene una única pauta de lectura abierta cuya transcripción genera una única poliproteína que se auto-procesa mediante las actividades proteasas asociadas a las proteínas P1, HC-Pro y NIa-Pro en 10 péptidos maduros (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001; Adams *et al.*, 2005).

Durante la última década se han venido utilizando mutantes defectivos de *A. thaliana* para identificar los factores que contribuyen a la infección viral. Así por ejemplo, el gen *Restricción del Movimiento de TEV (RTM)* limita el movimiento a larga distancia de TEV en diversos ecotipos (Mahajan *et al.*, 1998, Whitham *et al.*, 1999). Hasta el momento, se han estudiado tres clases de *loci RTM*: *RTM1* codifica una proteína similar a una jacalina, *RTM2* presenta homología a las proteínas de choque térmico con posible dominio transmembrana (Whitham *et al.*, 2000, Chisholm *et al.*, 2001). Ambas proteínas se expresan en tejidos asociados al floema. Un tercer *locus* denominado *RTM3* ha sido descrito (Carr y Whitham 2006), aunque su caracterización no ha sido todavía completada. Los ecotipos C24, Ler, Di-G, y Cvi-0 son portadores del alelo *rtm1* en homocigosis y, por tanto, susceptibles a la infección por TEV, presentando síntomas leves o incluso infecciones asintomáticas. El alelo dominante *RTM1* está presente en los ecotipos Col-0, Col-3 y Ws-2 por lo que TEV es capaz de moverse célula a célula en el foco de infección pero no de moverse a partes distales de la planta (Chisholm *et al.*, 2000, 2001).

Esta diversidad genética para la susceptibilidad a la infección con TEV nos va a permitir estudiar la especificidad de la adaptación de TEV-At17. Con este estudio queremos dar respuesta a la pregunta de si la adaptación de un virus emergente a un genotipo particular de su nueva especie huésped es específica o si, por el contrario, le da acceso a otros genotipos que varían en susceptibilidad al virus ancestral. Para responder a esta pregunta, estudiaremos la capacidad de los aislados ancestral y TEV-At17 de infectar sistémicamente y alcanzar tejido caulinar, además de inducir síntomas en el conjunto de ecotipos de *A. thaliana* incluidos en la Tabla 1.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Virus y plantas.** Plantas de *Nicotiana tabacum* var *Xhanti* de ocho semanas de edad se inocularon mediante abrasión de la tercera hoja verdadera con 5 µg de RNA proveniente de una transcripción *in vitro* del clon infeccioso pTEV-7DA (Dolja *et al.*, 1992) (GenBank DQ986288). Una semana post-inoculación, las plantas infectadas se emplearon como material de partida para obtener viriones de TEV siguiendo el protocolo descrito en Carrasco *et al.* (2007). Estos viriones constituirán nuestra reserva de virus ancestral para todos los experimentos descritos a continuación. El virus adaptado a *A. thaliana* Ler-0, TEV-At17, se obtuvo a partir de tejido caulinar de plantas de

este ecotipo tal y como se describe en (Agudelo-Romero *et al.*, 2008).

**Tabla 4.** Ecotipos de *A. thaliana* utilizados en el presente trabajo.

Ecotipo	Origen geográfico
Alc-0	España
Col-0	USA
Cvi-0	Islas de Cabo Verde
Ler-0	Alemania
Oy-0	Noruega
St-0	Suiza
Ta-0	República Checa
Tsu-0	Japón
Ws-0	Rusia

Para este trabajo se contó con los nueve ecotipos listados en la Tabla 1. Los ecotipos fueron elegidos en función de su distribución geográfica y, en aquellos casos para los que se había descrito, su susceptibilidad o no, a TEV. Se inocularon 16 plantas de cada ecotipo con cada uno de los dos genotipos virales, en estadios de crecimiento entre 3.5 y 3.7 según Boyes (2001). La infección fue confirmada analizando tejido caulinar 28 días post-inoculación (dpi). Para minimizar el riesgo de falsos negativos asociados con poca acumulación viral, se emplearon dos métodos diagnósticos distintos: hibridación de tipo Western utilizando un anticuerpo comercial anti-CP conjugado a la peroxidasa (Agdia) y RT-PCR en un solo paso amplificando 300 pb del gen NIb. Todas las inoculaciones se realizaron en un único bloque experimental.

Todas las plantas crecieron en un invernadero BSL-2, a 25 °C y con 16 h al día de luz.

**Extracción de RNA total.** La extracción de RNA total de plantas inoculadas se realizó a partir de 200 mg de tejido caulinar homogeneizado con N<sub>2</sub> líquido al que se añadieron 200 µL de tampón fosfato (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50mM pH=7.0 y polietilenglicol al 3%). Tras aclarar mediante centrifugación, se añadió al sobrenadante 1 volumen de fenol:clorformo:isoamilico (25:25:1) para RNA. Tras separar la fase acuosa, se procedió a la precipitación de los ácidos nucleicos con 1 volumen de una solución de LiCl 7.5 M + EDTA 50mM durante toda la noche a -20 °C. El precipitado se lavó con etanol al 70% a 4 °C. El precipitado se resuspendió en agua ultrapura tratada con DEPC al 0.1% y posteriormente autoclavada.

**RT-PCR en un solo paso.** El RNA anteriormente obtenido se empleó como molde para la síntesis de un cDNA mediante RT-PCR en un solo paso usando el One Step PrimeScrip™ RT-PCR Kit (Takara) siguiendo las instrucciones del fabricante. Esta reacción se realizó en un volumen final de 10 µL que contenían 2× One Step RT-PCR Buffer III, TaKaRa Ex Taq™ HS (5 U/µL), PrimeScrip™ RT enzyme Mix II, 10 µM de los cebadores PC90-95F 5'-GCTGTATTGAAAGTGCAC-3' y PC86-91R 5'-AGGCCCAACTCTCCGAAAG-3', 200 ng del RNA molde y agua ultrapura tratada con DEPC al 0.1% en

cantidad suficiente como para completar el volumen final. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Mastercycler® (Eppendorf). La transcripción reversa se realizó a 42 °C durante 5 min seguidos de 10 s a 95 °C. La amplificación del cDNA se realizó en 40 ciclos consistentes en 5 s a 95 °C, seguidos de 20 s a 60 °C. El producto final se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.

**Escala cualitativa de severidad de síntomas.** Los síntomas inducidos por cada uno de los genotipos virales se clasificaron de manera cualitativa según la siguiente escala. Clase A: plantas infectadas pero sin síntomas visibles (infección asintomática). Clase S: plantas infectadas sintomáticas. Los síntomas, a su vez, se clasificaron según su nivel de intensidad en: leves (1), moderados (2) y severos (3).

## RESULTADOS

### *Infectividad de TEV y TEV-At17 en los diferentes ecotipos de A. thaliana analizados*

La frecuencia de infección (infectividad) de los genotipos TEV y TEV-At17 en los diferentes fondos genéticos se muestra en la Tabla 2. Los únicos ecotipos que se infectaron con el virus ancestral fueron Ler-0 y St-0, con una infectividad del 0.9 y 0.75, respectivamente. Por un lado, este resultado confirma que el ecotipo Ler-0 es susceptible a TEV al ser homocigoto para el alelo recesivo *rtm1* (Chisholm *et al.*, 2000). El hecho de que el ecotipo St-0 también muestre una susceptibilidad elevada sugiere que debe también ser portador en homocigosis del alelo *rtm1*. Por el contrario, el ecotipo Cvi-0 que ha sido descrito como susceptible no resultó infectado en nuestros experimentos. Tampoco se infectaron sistémicamente los ecotipos Col-0, Alc-0, Oy-0, Ta-0, Tsu-0 y Ws-0. Este resultado corrobora que los ecotipos Col-0 y Ws-0 son resistentes al tener el alelo dominante *RTM1* (Carr y Whitham 2007). Aunque no está descrito en la literatura, podemos asumir que el resto de ecotipos también deben ser portadores del alelo dominante *RTM1* y, por tanto, resistentes a la infección sistémica con TEV.

**Tabla 2.** Infectividad de TEV y TEV-At17 en los distintos ecotipos de *A. thaliana*.

Frecuencia de plantas infectadas			
Ecotipo	TEV	TEV-At17	P*
Alc-0	0.00 ± 0.00	0.38 ± 0.13	0.011
Col-0	0.00 ± 0.00	0.06 ± 0.06	0.516
Cvi-0	0.00 ± 0.00	0.43 ± 0.14	0.006
Ler-0	0.90 ± 0.07	0.88 ± 0.09	0.608
Oy-0	0.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	< 0.001
St-0	0.75 ± 0.11	0.94 ± 0.06	0.166
Ta-0	0.00 ± 0.00	0.19 ± 0.10	0.125
Tsu-0	0.00 ± 0.00	0.75 ± 0.11	< 0.001
Ws-0	0.00 ± 0.00	0.13 ± 0.09	0.242

\* Prueba exacta de Fisher.

Cuando los mismos ecotipos fueron inoculados con TEV-At17, se detectó infección sistémica en todos ellos. No obstante, existe una variación significativa en los valores de infectividad entre los distintos ecotipos ( $\chi^2 = 69.87$ , 8 g.l.,  $P < 0.001$ ). Dentro del nivel de infección baja ( $\leq 0.33$ ) encontramos a los ecotipos Col-0, Ws-0 y Ta-0. Desde un punto de vista cuantitativo, no existe diferencia significativa entre la infectividades de TEV y TEV-At17 en estos tres ecotipos (Tabla 2,  $P \geq 0.125$ ). A pesar de esto, es cualitativamente interesante el hecho de que se hayan registrado infecciones sistémicas en los ecotipos Col-0 y Ws-0, ambos portadores confirmados del alelo *RTM1* y resistentes a la infección con el genotipo ancestral de TEV. Esto sugiere que TEV-At17 ha adquirido la capacidad de romper esta resistencia. Los ecotipos que presentan un nivel intermedio de infectividad ( $> 0.33$  y  $\leq 0.66$ ) son Alc-0 y Cvi-0 y en ambos casos la infectividad de TEV-At17 aumentó significativamente respecto a la de TEV en estos dos ecotipos (Tabla 2,  $P \leq 0.011$ ). Por último, los ecotipos Ler-0 y St-0 muestran infectividades elevadas ( $> 0.66$ ), lo que no es sorprendente ya que estos ecotipos también son susceptibles a TEV y homocigotos para el alelo *rtm1*. No obstante, no hay diferencias entre las infectividades del virus ancestral y evolucionado en estos dos ecotipos (Tabla 2,  $P \geq 0.166$ ). Así mismo, los ecotipos Oy-0 y Tsu-0 también presentan infectividades altas. Estos dos casos son particularmente interesantes ya que han pasado de no ser susceptibles al TEV a serlo completamente para TEV-At17 (Tabla 2,  $P < 0.001$ ).

Como se podría deducir directamente al mirar la Tabla 2, el ajuste de los datos a un modelo log-lineal demuestra que existe una interacción significativa entre el genotipo viral y el ecotipo de la planta ( $\chi^2 = 42.13$ , 19 g.l.,  $P = 0.002$ ), lo que da validez estadística a la conclusión de que, en efecto, la infectividad de cada genotipo de TEV depende del ecotipo en el que ésta se evalúa.

**Tabla 3.** Intensidad de los síntomas inducidos por ambos genotipos virales en cada uno de los ecotipos.

Ecotipo	TEV	TEV-At17
Alc-0	-	S3
Col-0	-	S2
Cvi-0	-	S1
Ler-0	A	S3
Oy-0	-	S2
St-0	S1	S3
Ta-0	-	S2
Tsu-0	-	S1
Ws-0	-	S3

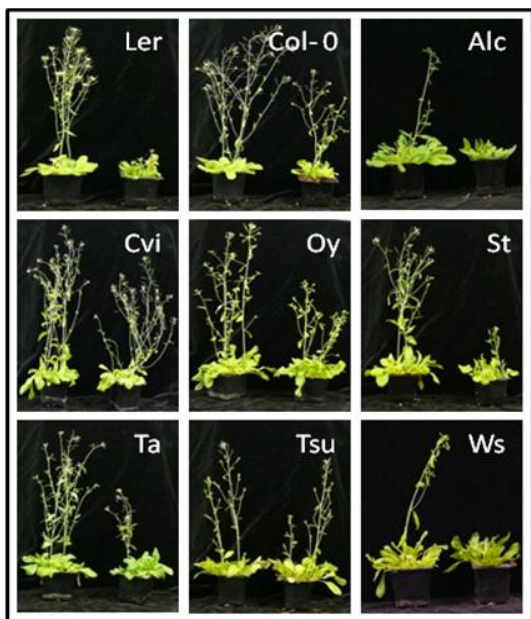
### *Síntomas inducidos por TEV y TEV-At17 en los diferentes ecotipos*

Las plantas infectadas de cada genotipo, presentan sintomatologías claramente diferenciadas (Tabla 3). Así, los ecotipos susceptibles para el genotipo ancestral de TEV, Ler-0 y St-0, presentaron infección asintomática (A) y síntomas moderados (S1), respectivamente. En estos mismos ecotipos, los síntomas inducidos por el genotipo

adaptado al ecotipo *Ler-0*, TEV-At17, fueron severos (S3) (Tabla 3).

En la Figura 1 se muestran, a modo de ilustración, los síntomas típicos inducidos por TEV-At17. En aquellos casos en los que las plantas fueron diagnosticadas como infectadas, los síntomas se clasificaron según la escala descrita en Material y Métodos. Los ecotipos que presentaban síntomas leves (S1) fueron *Cvi-0* y *Tsu-0*; *Col-0*, *Oy-0* y *Ta-0* mostraron síntomas moderados (S2); mientras que los ecotipos mostrando síntomas severos (S3) fueron *Alc-0*, *Ler-0*, *St-0* y *Ws-0*.

**Figura 1.** Síntomas inducidos por TEV-At17 (planta de la derecha). En cada caso se muestra un control de planta sana.



Para explorar si existe una asociación entre las dos variables medidas en este experimento, infectividad y severidad de los síntomas inducidos, se han calculado coeficientes de correlación de Spearman. En el caso del virus ancestral TEV, la correlación fue significativa ( $\rho = 0.969$ , 7 g.l.,  $P < 0.001$ ). Este resultado es obvio y consecuencia del hecho de que solamente plantas infectadas muestran síntomas. Más interesante es la falta de correlación observada para TEV-At17 ( $\rho = 0.018$ , 7 g.l.,  $P = 0.964$ ), lo que indica que la infectividad y la severidad de los síntomas inducidos son dos caracteres independientes.

## DISCUSIÓN

Los diferentes fondos genéticos de *A. thaliana* varían en su susceptibilidad al TEV en función de qué alelo poseen en los loci *RTM1*, *RTM2* y *RTM3* (Mahajan *et al.*, 1998, Whitham *et al.*, 1999). En este trabajo preliminar, hemos estudiado el movimiento a larga distancia de dos genotipos de TEV, que difieren en su grado de adaptación al ecotipo *Ler-0*; en nueve ecotipos de *A. thaliana* que difieren en su genotipo para el locus *RTM1*. Para ello, hemos inoculado tejido de roseta y analizando la presencia del virus en tejido caulinar. Además, hemos evaluado cuantitativamente la infectividad

y, cualitativamente, la severidad y tipo de los síntomas inducidos.

El genotipo TEV-At17 se generó en un estudio previo (Agudelo-Romero *et al.*, 2008) mediante un proceso de evolución experimental consistente en 17 pases seriados de una población viral en el ecotipo *Ler-0*. El virus resultante de este proceso mostraba niveles de acumulación tres órdenes de magnitud superiores al virus ancestral e inducía un síndrome severo. Posiblemente como consecuencia de su mayor acumulación, el virus también aumentó significativamente su infectividad en este ecotipo. Al finalizar la evolución experimental se estudiaron las bases moleculares de la adaptación, para lo que se obtuvo la secuencia consenso del genoma completo (9494 pb). Se encontraron cinco cambios a lo largo del genoma. Dos de estos cambios eran sinónimos (U537C en la proteína P1 y C6906U en el dominio proteasa de la proteína Nla) y tres fueron no sinónimos: A1047V en la proteína P3, T1210M en el péptido 6K1 y L2013F en el dominio VPg de la proteína Nla. Posteriormente, mediante experimentos de genética reversa se analizó el efecto de las cinco mutaciones simples, las mutaciones no sinónimas en las tres posibles combinaciones dobles (A1047V/T1210M, A1047V/L2013F y T1210M/L2013F) y el triple mutante (A1047V/T1210M/L2013F) sobre la sintomatología. Estos experimentos mostraron que la mutación L2013F en VPg es la responsable de la aparición de síntomas, mientras que la adición de las otras tres mutaciones no sinónimas contribuye de manera epistática a exacerbar los síntomas hasta que el triple mutante reproduce los síntomas inducidos por TEV-At17. La proteína P3 se localiza en núcleos y nucléolos en asociación con la proteína Nla y participa en la amplificación del virus con la interacción de la proteína CI (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001) y movimiento sistémico (Suehiro *et al.*, 2004, Choi *et al.*, 2005). El péptido 6K1, está implicado en patogenicidad (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001). El dominio VPg de la proteína Nla, se une covalentemente al extremo 5' del RNA y su función es esencial para la replicación del virus. Además, se ha descrito como factor clave para determinar la especificidad del genotipo del huésped en el movimiento sistémico o replicación (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001). Por último, recientemente se ha demostrado que la correcta interacción entre el factor de iniciación de la traducción eIF4B y la VPg de los potyvirus es necesaria para la infección (Charron *et al.*, 2008). Nicaise *et al.* (2007) dan apoyo a ésta hipótesis al encontrar que el factor eIF4E tiene la función de unión al complejo CAP, y que éste a su vez está asociado con el factor eIF4G. También, se ha descrito recientemente que la resistencia recesiva a potyvirus en pimientos depende de la sustitución de los residuos de aminoácidos G107R en el eIF4E que perturban la normal interacción entre el factor y la VPg (Yeam *et al.*, 2007). Con todas estas tintas, postulamos que el cambio L2013F mejoró la interacción entre VPg y el alelo de eIF4G de *Ler-0*, proporcionándole así al virus una ventaja adaptativa. Esta interacción, más aquellas en las que P3 y 6K1 puedan estar implicadas, le confirieron a TEV-At17 la capacidad de generar síntomas severos en *Ler-0* (enanismo, clorosis y malformaciones de hojas).

Algunos trabajos previos describen una relación causal entre la expansión de la gama de huéspedes y el papel general de las proteínas de unión en la adaptación del virus a sus nuevos huéspedes. Por ejemplo en estudios de laboratorio con fagos (Crill *et al.*, 2000), con el *Virus de la estomatitis vesicular* (Zárate y Novella 2004) o con el coronavirus causante del SARS (Poon *et al.*, 2005), y en estudios de epidemiología molecular realizados con el *Virus A de la gripe* (Parrish y Kawaoka 2005), y el *Parvovirus canino* (Shackelton *et al.*, 2005) se ha descrito que los virus parecen ser capaces de cambiar de huésped con tan sólo una o dos mutaciones (Baranowski *et al.*, 2001, Rainey *et al.*, 2003, Parrish y Kawaoka 2005, Duffy *et al.*, 2006, Ferris *et al.*, 2007).

En este trabajo hemos comprobado cómo TEV-At17 ha aumentado la infectividad y severidad de los síntomas inducidos en una colección de ecotipos de *A. thaliana* genéticamente heterogéneos con respecto al ecotipo en el que el virus evolucionó, Ler-0. Este resultado sugiere que las mutaciones responsables de la adaptación a Ler-0 muestran un efecto pleiotrópico beneficioso en otros fondos genéticos de la planta huésped. Este resultado extiende los resultados pioneros de Ostrowski *et al.* (2005). Estos autores observaron que una colección de mutaciones beneficiosas fijadas en distintas poblaciones de *Escherichia coli* adaptadas a glucosa como única fuente de carbono también eran, en su mayoría, beneficiosas en otros cinco ambientes diferentes, con lo que concluyeron que el pleiotropismo positivo era un fenómeno común.

Los resultados aquí descritos también tienen relevancia para el estudio de las enfermedades emergentes ya que sugieren que ciertas mutaciones beneficiosas para virus emergentes en un determinado genotipo del huésped podrían serlo en otros genotipos distintos, incluso en algunos previamente catalogados como resistentes. Regoes *et al.* (2000) analizaron desde un punto de vista teórico el efecto que la heterogeneidad poblacional para el carácter susceptibilidad tendría sobre la virulencia de un patógeno emergente. Estos modelos predicen que esta heterogeneidad debe imponer un límite al valor de virulencia alcanzado por el patógeno y que éste debería evolucionar como un generalista capaz de infectar distintos genotipos del huésped. Nuestros resultados muestran que existe variación significativa en la severidad de los síntomas inducidos en cada ecotipo, pero no podemos afirmar que los síntomas hayan alcanzado un valor máximo. Por el contrario, nuestros resultados sí están de acuerdo con la predicción de la evolución de un virus generalista, ya que hemos comprobado que TEV-At17 se comportaría como un virus generalista capaz de infectar con eficiencia variable genotipos del huésped que no eran accesibles para el virus ancestral TEV. En otro trabajo teórico, Day *et al.* (2006) sugieren que heterogeneidad en la susceptibilidad a la infección también limitarían la tasa de expansión de la epidemia. Nuestros resultados no aportan información en este sentido, pero futuros experimentos en los que TEV-At17 sea evolucionado en poblaciones polimórficas de *A. thaliana* (mezclas de distintos ecotipos) podrían ayudar a comprobar la validez de esta interesante predicción.

Estos resultados también cuestionan la noción misma de genes de resistencia, tan arraigada en patología vegetal. Nuestros resultados sugieren que el gen de resistencia

*RTM1* solamente tiene sentido para la interacción entre Col-0 y el genotipo de TEV empleado en los experimentos originales de Chisholm *et al.* (2000, 2001), pero que variación genética en proteínas virales rápidamente cambian el delicado balance entre éstas y los factores del huésped haciendo que la interacción se decante en una dirección completamente distinta a la esperada por la presencia del alelo de resistencia.

En estos momentos, los resultados aquí expuestos están siendo extendidos a una colección más amplia de ecotipos. Además, estamos procediendo a cuantificar la carga viral en cada uno de los ecotipos con el fin de correlacionar la infectividad con la cantidad de partículas virales producidas.

## AGRADECIMIENTOS

Queremos manifestar nuestro agradecimiento a Paqui de la Iglesia por su excelente apoyo técnico y al resto de compañeros del grupo de Virología Evolutiva por su apoyo y valiosos consejos y discusión. Esta investigación ha sido financiada por el proyecto BFU2006-14819-C02-01/BMC concedido por el Ministerio de Ciencia e Innovación, Gobierno de España.

## BIBLIOGRAFÍA

- Adams MJ, Antoniw JF, Beaudoin F. 2005. Overview and analysis of the polyprotein cleavage sites in the family *Potyviridae*. *Mol. Plant. Pathol.* **6**: 471-487.
- Agudelo-Romero P y Elena SF. 2008. The degree of plant resilience to infection correlates with virus virulence and host-range. *Spanish J. Agric. Res.* **6**: 160-169.
- Agudelo-Romero P, Carbonell P, Pérez-Amador MA, Elena SF. 2008. Virus adaptation by manipulation of host's gene expression. *PLoS ONE* **3**: e2397.
- Antia R, Regoes RR, Koella JC, Bergstrom CT. 2003. The role of evolution in the emergence of infectious diseases. *Nature* **426**: 658-661.
- Baranowski E, Ruiz-Jarabo CM, Domingo E. 2001. Evolution of cell recognition by viruses. *Science* **292**: 1102-1105.
- Boyes DC, Zayed AM, Ascenzi R, McCaskil AJ, Hoffman NE, Davies KR, Görlach J. 2001. Growth stage-based phenotypic analysis of Arabidopsis: a model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell* **13**: 1499-1510.
- Carr T y Whitham SA. 2007. An emerging model system: Arabidopsis as a viral host plant. *Plant Cell Monogr.* **7**: 159-183.
- Carrasco P, Daròs JA, Agudelo-Romero P, Elena SF. 2007. A real-time RT-PCR assay for quantifying the fitness of *Tobacco etch virus* in competition experiments. *J. Virol. Meth.* **139**: 181-188.
- Charron C, Nicolai M, Gallois JL, Robaglia C, Moury B, Palloix A, Caranta C. 2008. Natural variation and functional analyses provide evidence for co-evolution between plant eIF4E and potyviral VPg. *Plant J.* **54**: 56-68.
- Chisholm ST, Mahajan SK, Whitham SA, Yamamoto ML, Carrington JC. 2000. Cloning of Arabidopsis *RTM1* gene, which controls restriction of long-distance movement of *Tobacco etch virus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 489-494.

- Chisholm ST, Parra MA, Anderberg RJ, Carrington JC. 2001. *RTM1* and *RTM2* genes function in phloem to restrict long-distance movement of *Tobacco etch virus*. *Plant Physiol.* **127**: 1667-1675.
- Choi IR, Horken KM, Stenger DC, French R. 2005. An internal RNA element in the P3 cistron of *Wheat streak mosaic virus* revealed by synonymous mutations that affect both movement and replication. *J. Gen. Virol.* **86**: 2605-2614.
- Crill WD, Wichman HA, Bull JJ. 2000. Evolutionary reversals during viral adaptation to alternating hosts. *Genetics* **154**: 37-37.
- Day T, Andre JB, Park A. 2006. The evolutionary emergence of pandemic influenza. *Proc. Biol. Sci.* **1604**: 2945-2953.
- Dolja V, McBride HJ, Carrington JC. 1992. Tagging of plant potyvirus replication and movement by insertion of  $\beta$ -glucuronidase into the viral polyprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 10208-10212.
- Duffy S, Turner PE, Burch CL. 2006. Pleiotropic costs of niche expansion in the RNA bacteriophage  $\phi 6$ . *Genetics* **172**: 751-757.
- Elena SF y Lenski RE. 2003. Evolution experiments with microorganisms: the dynamics and genetic bases of adaptation. *Nat. Rev. Genet.* **4**: 457-469.
- Elena SF y Sanjuán R. 2007. Virus evolution: Insights from an experimental approach. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **38**: 27-52.
- Fargette D, Konate G, Fauquet C, Muller E, Peterschmitt M, Thresh JM. 2006. Molecular ecology and emergence of tropical plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* **44**: 235-260.
- Ferris MT, Joyce P, Burch CL. 2007. High frequency of mutations that expand the host range of an RNA virus. *Genetics* **176**: 1013-1022.
- Fry JD. 1996. The evolution of host specialization: Are trade-offs overrated? *Am. Nat.* **148**: S84-S107.
- Levins R. 1962. Theory of fitness in a heterogeneous environment. I. The fitness set and adaptive function. *Am. Nat.* **96**: 361-373.
- Levins R. 1963. Theory of fitness in a heterogeneous environment. II. Developmental flexibility and niche selection. *Am. Nat.* **97**: 75-90.
- Mahajan SK, Chisholm ST, Whitham SA, Carrington JC. 1998. Identification and characterization of a locus (*RTM1*) that restricts long-distance movement of *Tobacco etch virus* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **14**: 177-186.
- Moya A, Holmes EC, Gonzalez-Candelas F. 2004. The population genetics and evolutionary epidemiology of RNA viruses. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**: 279-288.
- Nicaise V, Gallois JL, Chafiai F, Allen LM, Schurdi-Levraud V, Browning KS, Candresse T, Caranta C, Le Gall O, German-Retana S. 2007. Coordinated and selective recruitment of eIF4E and eIF4G factors for potyvirus infection in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **581**: 1041-1046.
- Novella IS, Clarke DK, Quer J, Duarte EA, Lee CH, Weaver SC, Elena SF, Moya A, Domingo E, Holland JJ. 1995. Extreme fitness differences in mammalian and insect hosts after continuous replication of *vesicular stomatitis virus* in sandfly cells. *J. Virol.* **69**: 6805-6809.
- Ostrowski EA, Rozen DE, Lenski RE. 2005. Pleiotropic effects of beneficial mutations in *Escherichia coli*. *Genetics* **59**: 2343-2352.
- Parrish CR y Kawaoka Y. 2005. The origins of new pandemic viruses: the acquisition of new host ranges by *Canine parvovirus* and *Influenza A viruses*. *Annu. Rev. Microbiol.* **59**: 553-586.
- Poon LL, Leung CS, Chan KH, Yuen KY, Guan Y, Peiris JS. 2005. Recurrent mutations associated with isolation and passage of SARS coronavirus in cells from non-human primates. *J. Med. Virol.* **76**: 435-440.
- Presluid JB, Ebendick-Corp BE, Zárate S, Novella IS. 2008. Antagonistic pleiotropy involving promoter sequences in a virus. *J. Mol. Biol.* **382**: 342-352.
- Rainey GJ, Natonson A, Maxfield LF, Coffin JM. 2003. Mechanisms of avian retroviral host range extension. *J. Virol.* **77**: 6709-6719.
- Regoes RR, Nowak MA, Bonhoeffer S. 2000. Evolution of virulence in a heterogeneous host population. *Evolution* **54**: 64-71.
- Remold SK, Rambaut A, Turner PE. 2008. Evolutionary genomics of host adaptation in *vesicular stomatitis virus*. *Mol. Biol. Evol.* **25**: 1138-1147.
- Shackelton LA, Parrish CR, Truyen U, Holmes EC. 2005. High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 379-384.
- Suehiro N, Natsuaki T, Watanabe T, Okuda S. 2004. An important determinant of the ability of *Turnip mosaic virus* to infect *Brassica spp.* and/or *Raphanus sativus* is in its P3 protein. *J. Gen. Virol.* **85**: 2087-2098.
- Turner PE y Elena SF. 2000. Cost of host radiation in an RNA virus. *Genetics* **156**: 1465-1470.
- Urcuqui-Inchima S, Haenni AL, Bernardi F. 2001. Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus Res.* **74**: 157-175.
- Whitham SA, Anderberg RJ, Chisholm ST, Carrington JC. 2000. *Arabidopsis RTM2* gene is necessary for specific restriction of *Tobacco etch virus* and encodes an unusual small heat shock-like protein. *Plant Cell* **12**: 569-582.
- Whitham SA, Yamamoto ML, Carrington JC. 1999. Selectable viruses and altered susceptibility mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 772-777.
- Whitham SA, Yang C, Goodin MM. 2006. Global impact: elucidating plant responses to viral infection. *Mol Plant Microbe Interact.* **19**: 1207-1215.
- Woolhouse ME, Taylor LH, Haydon DT. 2001. Population biology of multihost pathogens. *Science* **11**: 1109-1112.
- Woolhouse ME, Haydon DT, Antia R. 2005. Emerging pathogens: the epidemiology and evolution of species jumps. *Trends Ecol. Evol.* **20**: 238-244.
- Yeam I, Cavatorta JR, Ripoll DR, Kang BC, Jahn MM. 2007. Functional dissection of naturally occurring amino acid substitutions in eIF4E that confers recessive potyvirus resistance in plants. *Plant Cell* **19**: 2913-2928.
- Zárate S y Novella IS. 2004. *Vesicular stomatitis virus* evolution during alternation between persistent infection in insect cells and acute infection in mammalian cells is dominated by the persistence phase. *J. Virol.* **78**: 12236-12242.

## DISCUSIÓN GENERAL

---





## DISCUSIÓN GENERAL

**E**n la actualidad, es absolutamente necesario tomar medidas preventivas para minimizar el impacto que agentes patógenos de todo tipo provocan en la producción agrícola mundial y que generan grandes pérdidas económicas, principalmente en cultivos hortícolas y ornamentales, con la consecuente disminución en la capacidad de alimentar, una cada vez mayor y más exigente, población humana. La evolución experimental de virus de plantas es una herramienta que firmemente creemos nos permitirá esclarecer los factores implícitos en el establecimiento de interacciones entre patógenos emergentes y sus potenciales nuevos huéspedes. En particular, los virus de RNA son un excelente modelo experimental dada su alta variabilidad genética y potencial evolutivo, patogenicidad y relativamente amplia gama de huéspedes. En este trabajo hemos simulado procesos de emergencia viral con la intención de establecer qué factores intervienen en la adaptación de un virus a diferentes nichos ecológicos. Expresándolo de manera sencilla “si no puedes con tu enemigo, únete a él”; así será nuestro enemigo quien nos indique las pautas a seguir para alcanzar un mejor entendimiento de la interacción con su huésped y llegar a diseñar futuros métodos de control de las enfermedades virales más racionales y que tengan en cuenta la tremenda capacidad evolutiva de estos patógenos. Para abordar este problema quisimos conocer el efecto de la ampliación de la gama de huéspedes a una especie filogenéticamente muy relacionada y a otra más alejada.

### **D. 1. Coste de la ampliación de la gama de huéspedes de TEV en especies relacionadas**

#### *D.1.1 Efectos pleiotrópicos*

En términos generales, algunos virus de plantas infectan sólo una o muy pocas especies vegetales, generalmente relacionadas filogenéticamente (virus especialistas), mientras que otros pueden infectar a una amplia gama de huéspedes, incluso pertenecientes a unidades taxonómicas de rango superior al género (virus generalistas). Las ventajas del generalismo parecen obvias: acceder a una mayor cantidad de recursos. No obstante, la mayoría de las especies parecen evitar esta estrategia y se convierten en especialistas, por lo que alguna desventaja, todavía no del todo clara, debe estar asociada con el generalismo. Las teorías evolutivas asumen un coste para el generalismo, de manera que un virus no podría maximizar su eficacia biológica en todos los posibles nichos evolutivos, de tal modo que un especialista siempre será más eficaz en su huésped que lo sería un generalista (Woolhouse *et al.*, 2001). En concordancia con esta hipótesis, ha sido ampliamente documentado que la adaptación a un

huésped específico está acompañada frecuentemente de pérdidas de eficacia a otros huéspedes, debido a que las mutaciones que son beneficiosas en el primer huésped pueden ser perjudiciales en el alternativo (Kawecki 1994).

En nuestro primer experimento de evolución (Capítulo 1) estudiamos cómo la virulencia de TEV en dos huéspedes pertenecientes a la misma familia (*Solanaceae*) cambiaba a lo largo del tiempo, comparando el cambio de la virulencia en el huésped original con el ocurrido en el huésped donde se llevó a cabo la evolución. Esto nos ha permitido analizar el coste de la ampliación de la gama de huéspedes relacionados. El experimento de evolución consistió en cuatro linajes independientes para cada una de las dos especies *C. annuum* y *N. tabacum*. Se transmitió horizontalmente el virus durante 15 pases sin diluir. Primero se midió la mediana del número de dosis infecciosas producida por gramo de tejido vegetal (Hamilton *et al.*, 1977) y a partir de este valor se estandarizó el inóculo de las plantas a la misma dosis infectiva para medir así los distintos rasgos de la virulencia en cada planta sin que la medida estuviese sesgada por diferencias en el inóculo empleado. Estas medidas se realizaron para cada linaje al principio del experimento de evolución y cada cinco pases en el huésped donde tenía lugar el proceso así como en el huésped alternativo. Aquí definimos virulencia como el grado de daño causado a la planta tras la infección viral (Shaner *et al.*, 1999; Sacristán y García-Arenal 2008). Se midió el efecto de la infección en tres caracteres de la planta, altura (*h*), peso fresco (*fw*), y peso seco (*dw*). Un análisis de componentes principales redujo estas tres variables a una sola, a la que llamaremos virulencia, y que explicaba gran parte de la varianza observada.

Se observó que a lo largo de los pases seriados en el nuevo huésped, la virulencia aumentaba significativamente, mientras que al cuantificar la virulencia de estos linajes en el huésped ancestral, ésta no aumentaba. Existiría una correlación positiva entre las virulencias medidas en los dos huéspedes si los cambios responsables del aumento de la virulencia en el huésped natural también generasen un aumento equivalente en la virulencia del huésped alternativo, una predicción que no se cumple en nuestro caso. Por el contrario, sí existe un compromiso entre la virulencia en los huéspedes: al aumentar ésta en el nuevo huésped, podría decrecer en el huésped natural. Así, el linaje más virulento en un huésped debería ser el menos virulento en el alternativo y viceversa, generándose una correlación negativa, tal y como hemos observado en nuestro experimento.

En este trabajo observamos que al adaptarse TEV a su nuevo huésped (*C. annuum*), pierde su nivel de adaptación al huésped ancestral (*N. tabacum*). Los linajes evolucionados en pimiento aumentaron rápidamente su virulencia en pimiento, mientras que mostraban una

disminución rápida de su virulencia en tabaco. Un efecto similar a éste ha sido ampliamente descrito para virus animales evolucionados en distintos tipos de cultivos celulares (p.ej., Turner y Elena 2000). Por el contrario, los linajes evolucionados en tabaco experimentan cambios mínimos no significativos en su virulencia en ambos huéspedes alternativos, posiblemente debido a que TEV se encuentre ya adaptado a tabaco.

Sacristán *et al.* (2005) mostraron que al evolucionar experimentalmente diferentes aislados de CMV durante cortos plazos de tiempo en diferentes huéspedes, no se encontró un compromiso adaptativo entre la capacidad de multiplicarse y la virulencia en ninguno de los casos. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la interacción virus-huésped determina la respuesta a la selección entre huéspedes, pues cuando se ha alcanzado un valor máximo en la eficacia biológica en un huésped ésta se muestra estable. La existencia de un valor máximo de eficacia para un determinado huésped ha sido también ampliamente demostrada en experimentos realizados en cultivos celulares con varios virus animales (Novella *et al.*, 1995; Elena *et al.*, 1998; van Opijnen *et al.*, 2007) y con bacteriófagos (Wichman *et al.*, 1999).

Al explorar la evolución de la carga viral (medida en este caso como  $\log ID_{50}$ ), se reprodujo la conclusión descrita en la virulencia. Se observó un notable aumento en la carga viral en pimiento para los linajes evolucionados en este mismo huésped, pero este aumento no se correlacionó con la carga viral determinada en tabaco. Esta falta de asociación sugiere que el efecto beneficioso de las mutaciones en el aumento de la eficacia biológica en pimiento permite la especialización a este nuevo huésped no desempeña ningún papel beneficioso en tabaco. Asimismo es posible que el incremento significativo en la virulencia refleje el aumento del número de partículas infecciosas funcionales acumuladas.

Para caracterizar a nivel genotípico el proceso evolutivo en relación con cada uno de los dos huéspedes, se obtuvieron secuencias consenso al final del experimento de evolución. Con este fin se escogieron dos linajes al azar de tabaco como control. Ambos presentaron cambios sinónimos y no sinónimos. Curiosamente, ambos mostraron diferentes cambios no sinónimos en los genes NIa y NIb. En el caso de pimiento se secuenciaron los cuatro linajes, presentando varios de ellos sustituciones específicas sinónimas, que apoya la posibilidad de que no exista la contaminación entre linajes. Tres linajes comparten la misma sustitución de aminoácidos (V por A) en la proteína HC-Pro; este cambio podría alterar la actividad supresora de HC-Pro en la respuesta a pequeñas diferencias en la actividad del silenciamiento del RNA entre tabaco y pimiento. La convergencia de cambios en la secuencia nucleotídica es un fenómeno ya ampliamente descrito en poblaciones virales y explicado como una consecuencia del limitado

tamaño del genoma y la fuerte presión de selección por parte del huésped (Crill *et al.*, 2000; Cuevas *et al.*, 2002; Rico *et al.*, 2006; Remold *et al.*, 2008). Sorprendentemente, ni un solo cambio no sinónimo ha sido identificado en el linaje 4 de pimiento, esto podría deberse a que el esfuerzo por secuenciar no hubiese sido suficiente o que, en su defecto, el cambio sinónimo pueden desempeñar un papel en la adaptación del virus. Curiosamente, Carrasco *et al.* (2007) exploraron diferentes cambios sinónimos y no sinónimos a lo largo del genoma del TEV y en uno de los casos, un cambio sinónimo afectaba positivamente la eficacia del virus. Aunque es habitual clasificar los cambios sinónimos como selectivamente neutros, no puede descartarse que éstos tengan efectos sobre la eficacia en virus cuyos genomas son de simple cadena (tanto RNA como DNA), pues puede afectar a la estructura secundaria del ácido nucleico.

En resumen, de este experimento podemos concluir que la adaptación a pimiento impuso una restricción sobre la eficacia biológica en el huésped natural tabaco, a pesar de que ambos pertenecen a la misma familia de plantas. Sin embargo, la evolución en tabaco no afectó a la eficacia biológica en el huésped alternativo, como era previsible por estar ya el virus adaptado a tabaco. Este efecto pleiotrópico antagónico podría limitar la gama de huéspedes y promover la evolución hacia la especialización.

## **D.2. Coste de la ampliación de la gama de huéspedes de TEV a especies filogenéticamente alejadas: el caso de *Arabidopsis thaliana***

### *D.2.1. Análisis del perfil transcripcional de *Arabidopsis thaliana* Ler-0 infectada con TEV*

Los virus son parásitos de naturaleza simple que están obligados a usurpar o desviar recursos del huésped de sus funciones normales para su propio beneficio y que, en consecuencia, inducen una variedad de respuestas en las células de su huésped, algunas relacionadas con la respuesta inmunitaria a la infección y otras simple consecuencia de la perturbación de diferentes rutas de señalización de la planta. Algunas alteraciones pueden ejercer un impacto directamente sobre la replicación, el movimiento célula a célula o sistémico y la acumulación del virus, mientras que otras alteraciones pueden ser simplemente efectos secundarios de la replicación del virus. En la actualidad ha aumentado el conocimiento sobre las funciones de las proteínas virales, lo que nos proporciona una visión general de lo que ocurre dentro de la planta huésped durante la infección viral.

Bajo este planteamiento, nuestro objetivo es conocer cómo se ve afectado el patrón general de transcripción del huésped parcialmente susceptible *A. thaliana* Ler-0 (Chisholm *et al.*, 2000, 2001), tras la infección con TEV, sistema modelo entre los *Potyvirus*. Este enfoque nos ha permitido analizar simultáneamente la respuesta de 28964 genes codificantes y 87

miRNAs a la infección de TEV. De todo este conjunto de genes, se observan cambios significativos en el patrón de expresión de 1727 (1027 sobreexpresados y 700 subexpresados), los cuales nos proporcionan un conjunto de genes candidatos para una investigación más a fondo de la interacción entre TEV y *A. thaliana*.

Al estudiar la distribución de los genes sobre- o subexpresados, se observó que no están preferentemente situados en regiones contiguas de los cromosomas, sino más bien distribuidos al azar en el genoma de *A. thaliana*. Dentro del metabolismo primario y del ciclo celular, se encontraron alterados los genes que participan en la biogénesis y la actividad del cloroplasto, que están infrarepresentados entre los genes subexpresados. Esta lista incluye los genes implicados en la biosíntesis de clorofila y la fijación de carbono, lo que sugiere un posible mecanismo en la aparición de la clorosis y el ligero retraso en el crecimiento de las plantas de *A. thaliana* infectadas con TEV.

Los genes que participan en el metabolismo del DNA también estuvieron infrarrepresentados entre los genes sobreexpresados en las plantas infectadas. El primero de estos genes, *At3g19150*, corresponde al gen *Kip* que codifica la proteína KRP con actividad ciclina dependiente del inhibidor de quinasas, la cual actúa como regulador negativo de la división celular. Así pues, la subexpresión de este gen podría acelerar la división celular. El segundo gen, *At5g04560*, codifica la DME DNA glicosilasa que activa el MEA del alelo materno en el endospermo. El tercer gen, *At5g64630*, codifica para la subunidad p60 del factor CAF1 que es requerido para la diferenciación celular. Por lo tanto, estos genes subexpresados pueden afectar a la división y la diferenciación celular.

Entre las posibles respuestas antivirales se encontró alterada la ruta del SA, las proteínas de choque térmico, algunos factores de transcripción y los niveles de una fitohormona. En concordancia con otros estudios previos similares realizados para otros virus (Whitham *et al.*, 2003), hemos encontrado una sobreexpresión del gen *PAD4*, que participa en la señalización durante las respuestas de defensa de la planta, lo que sugiere que podríamos estar ante una respuesta general a la infección de cualquier virus más que una respuesta específica a TEV. *PAD4* (junto con muchos otros genes, como *BG2*, *PR1*, *ACT5* y *PAD3*) están controlados a través de la ruta de señalización del SA. Hemos encontrado que la ruta del SA es una de las más alteradas tras la infección con TEV, con ciertos genes sobrerrepresentados entre las categorías GO alteradas y algunos otros infrarrepresentados.

Nuestros resultados confirman que la sobreexpresión de las proteínas de choque térmico (HSP) es una respuesta general a la infección viral ya que estas proteínas también han sido descritas como sobreexpresadas tras la infección de otros virus. La sobreexpresión de HSP puede ser parte de una respuesta general a la infección, tal como describieron Jockusch *et al.* (2002) trabajando con mutantes de la proteína de cubierta de TMV o un mecanismo específico de respuesta, al encontrarse con frecuencia en respuestas de virus de plantas y animales (Aranda *et al.*, 1996; Mayer 2005). Estos estudios sugieren que estas proteínas pueden ser necesarias para la replicación del virus, pero también son compatibles con una reciente hipótesis según la cual podrían estar siendo usadas por el virus como mecanismo de compensación de la alta carga mutacional que los virus de RNA pueden llegar a acumular durante la errónea replicación de sus genomas (Elena *et al.*, 2006).

Los factores de transcripción *R2R3-MYB* están involucrados en la respuesta de la planta al estrés medioambiental y su expresión está fuertemente correlacionada con la muerte celular durante la respuesta hipersensible al ataque de patógenos, para la que actuarían como reguladores positivos (Vailleau *et al.*, 2002). De igual forma participan en diversos procesos celulares como la regulación del metabolismo secundario, el control del desarrollo, la determinación del destino celular y la identidad celular. Además, estos factores de transcripción podrían interaccionar con otros factores de transcripción en la generación de patrones específicos de expresión (Stracke *et al.*, 2001). Respecto a la infección con TEV, la respuesta de los genes *MYB* es muy variable. Así, los genes *TRP1* y *MYBL2* están subexpresados (participan en la mediación de las respuestas de SA y JA a patógenos), mientras que están sobreexpresados entre los genes implicados en la categoría de respuesta a estímulo de etileno y la respuesta a la contaminación con iones metálicos. Hemos observado que varios factores de transcripción activados por ABA, así como una proteína quinasa activada por ABA, han sido subexpresadas en las plantas infectadas con TEV.

Los síntomas de las plantas infectadas por los potyvirus están asociados con la actividad supresora del silenciamiento del RNA desempeñada por la proteína HC-Pro, que interfiere con las funciones endógenas de miRNA (Kasschau *et al.*, 2003). Sin embargo, ninguno de los 87 miRNAs presentes en la micromatriz empleada mostró alteración significativa en las plantas infectadas, lo que indica que este enfoque no fue adecuado para la identificación de los genes regulados por miRNA.

De forma general podemos concluir que nuestro estudio demuestra la existencia de gran variedad de efectos causados por la infección de TEV en un huésped parcialmente

susceptible. Las alteraciones en la expresión génica del metabolismo primario y del ciclo celular observadas en los genes que participan en respuestas a estreses bióticos pueden afectar al desarrollo de síntomas leves en las plantas. La alteración de otros genes en el transcriptoma de *A. thaliana*, como *PDA4* y la familia de HSP, no puede ser considerada como específicamente asociada a la infección de TEV, sino que forma parte de la respuesta general de estrés inducida por la infección viral. No obstante, este tipo de experimentos diseñados específicamente para caracterizar las respuestas del huésped a la infección viral pueden contribuir a dilucidar el resistoma de la planta, es decir, los mecanismos que subyacen en la planta y que constituyen las respuestas defensivas frente a la infección por virus.

#### *D.2.2. Cambios en el patrón de expresión génica de la planta tras la adaptación de TEV*

Los virus se propagan desde su huésped natural a otras especies nuevas por lo general con poco éxito. En el caso de que la transmisión entre especies sea un fenómeno habitual, las probabilidades de que un genotipo viral adaptado a la nueva especie sea generado por azar en la especie original y posteriormente transmitido a la nueva es un fenómeno con una cierta probabilidad no despreciable. Si esto ocurre, el nuevo virus debe ser capaz de replicar en el nuevo huésped, aunque sea de modo ineficiente, para así generar las condiciones necesarias para que aparezcan nuevas mutaciones beneficiosas que aumenten la eficacia viral en el nuevo huésped. Esta situación representaría el caso de la emergencia de un nuevo virus. La adaptación a un nuevo huésped necesariamente conlleva la capacidad de eludir los mecanismos de defensa para hacer uso del metabolismo celular en su propio beneficio. En el Capítulo 3 de esta tesis mostramos el resultado de un experimento de evolución en que TEV salta la barrera de familia y se adapta a *A. thaliana*. Nuestro objetivo ha sido simular la emergencia de un nuevo virus de plantas que cruza la barrera de las especies y se propaga horizontalmente en una población parcialmente susceptible de huéspedes. El experimento de evolución se inició con siete linajes fundadores, seis de estos se extinguieron debido a que el virus no alcanzaba un tamaño poblacional suficientemente grande como para garantizar su transmisión mecánica. El único linaje superviviente se mantuvo durante 17 pasajes seriales y lo hemos bautizado como TEV-At17.

Fenotípicamente TEV-At17, aumentó su carga viral ~44 veces con respecto al valor estimado para el TEV ancestral. Así mismo, la infectividad de TEV-At17 aumentó hasta 100%. TEV-At17, también genera síntomas severos que incluyen enanismo, clorosis y deformación en las hojas y que no eran generados por el virus ancestral. A nivel genotípico observamos que después de 17 pases seriados, el genoma viral sólo había acumulado cinco cambios, tres de los

cuales eran no sinónimos. Se utilizó mutagénesis dirigida para analizar el efecto fenotípico de estos cambios y sus combinaciones, y se encontró que solamente el cambio visto en el dominio VPg de la proteína NIa era responsable de la aparición de síntomas, mientras las sustituciones en las proteínas P3 y 6K1 contribuían epistáticamente a exacerbar la severidad de los síntomas. No analizamos el posible efecto de las mutaciones sinónimas. Recientemente se ha descrito la interacción entre la VPg de los potyvirus y el factor eIF4E del huésped, que es requerido para iniciar la infección con éxito en plantas de pimiento resistentes a la infección con PVY (Charron *et al.*, 2008). En estos estudios cepas de PVY capaces de romper la resistencia lo hacen mediante el restablecimiento de la interacción normal con eIF4E. Haciendo extensivos estos resultados a nuestro trabajo, podemos postular que TEV-At17 ha optimizando su capacidad de infectar a *A. thaliana* mejorando la interacción de su VPg con el factor de inicio de traducción eIF4E.

Tras describir a nivel fenotípico y genotípico el proceso de adaptación de TEV a *A. thaliana*, nos propusimos conocer si este proceso adaptativo cambiaba la manera en la que el TEV interaccionaba con el transcriptoma de la planta, para desentrañar qué componentes de la interacción entre los genes y rutas metabólicas de la planta podían ser dianas del proceso adaptativo viral. Para ello, volvimos a utilizar micromatrices de cDNA. En este caso se analizaron 13722 puntos, correspondientes a 12180 genes, que fueron normalizados con respecto a las plantas no infectadas, con el fin de identificar diferencias en la expresión de genes en plantas infectadas con el virus ancestral y en plantas infectadas con TEV-At17. De esta manera se encontró que 496 genes estaban sobreexpresados y 1322 genes estaban subexpresados en plantas infectadas con TEV-At17 con respecto a plantas infectadas con el genotipo ancestral, habiendo pues aproximadamente 2.7 veces más genes subexpresados. Los genes expresados diferencialmente se agruparon en mapas de auto organización (SOM), observándose 3 patrones globales de expresión génica (Tabla 4).



**Tabla 4.** Patrones de expresión génica de plantas infectadas con el TEV ancestral y TEV-At17 agrupados en mapas de auto-organización (SOM).

		Patrón de TEV*	Patrón de TEV-At17*	Características del patrón de TEV-At17
<b>SOBRE-EXPRESADOS</b>				
<b>SOM A1 + A2</b>	32 + 98	↑	↑↑	Encontramos a <i>PR1</i> , marcador de la activación de SA (defensa), activa SAR
<b>SOM A3</b>	141	↓	↔	Genes relacionados con estrés salino
<b>SOM A4</b>	234	↔	↑	
<b>SUBEXPRESADOS</b>				
<b>SOM B1+ B2</b>	466 + 217	↑	↔	Encontramos a <i>PR5</i> , similar a <i>PR4</i> (proteínas de la clase TIR-NBS-LRR)
<b>SOM B3</b>	196	↓	↓↓	Respuesta a auxinas
<b>SOM B4</b>	456	↔	↓	Los factores de transcripción se muestran diferencialmente afectados respecto a TEV.

\* El patrón de expresión de TEV y TEV-At17 comparado al patrón de las plantas no infectadas.

Para explorar qué clases funcionales estaban siendo diferencialmente manipuladas por los virus ancestral y evolucionado se aplicó el algoritmo FatiGO (Al-Shahrour *et al.*, 2005) a la lista de genes no- redundantes agrupados en cada SOM y se encontró un gran número de categorías GO de genes significativamente infra- y sobrerrepresentados entre los genes sobreexpresados. Dentro de los genes no redundantes correspondiente a los SOMs B1 + B2, los genes sobrerrepresentados curiosamente pertenecen a las categorías funcionales relacionadas con la respuesta al estreses abiótico (heridas, intensidad de luz, temperatura, y salinidad) y biótico. Por otra parte, no fueron expresados en las plantas infectadas con TEV-At17 los genes involucrados en SAR y la activación de la respuesta inmunitaria innata (Jones y Dangl 2006), mientras que estos genes estaban sobreexpresados en las plantas infectadas con el TEV ancestral, lo que indica que el virus ha adquirido la capacidad de evadir ciertos mecanismos de defensa de la planta, lo que tal vez pueda ayudar a explicar el aumento de la carga viral observada. Los genes implicados en procesos celulares básicos como son el metabolismo de los ácidos nucleicos, la traducción y la proteólisis están infrarepresentados entre los genes sobreexpresados en los SOMs B1 + B2, lo que apunta en la dirección de que la planta puede estar intentando compensar el excesivo consumo de estos recursos asociado al aumento de la replicación viral.

Podemos concluir de estos experimentos que la adaptación de TEV-At17 a su nuevo huésped generó cambios fenotípicos como el exacerbamiento de los síntomas, el aumento de la carga viral y su más eficiente transmisión. Todos estos cambios fenotípicos están asociados a pocos cambios genéticos. En particular, el desarrollo de síntomas se debe a una única sustitución no sinónima en la proteína NIa-VPg. Aceptando la hipótesis de que la adaptación

viral debería ocurrir a través de la integración de la replicación viral en los procesos fisiológicos del huésped, de sus circuitos genéticos e interacciones metabólicas, necesariamente los cambios genotípicos y fenotípicos del virus son producto esta integración. La selección natural ha favorecido una combinación de cambios genéticos que ha permitido a TEV-At17 evitar la expresión de los genes involucrados en la señalización de algunas rutas de respuesta a estrés, manipulando así los mecanismos de defensa de la planta.

#### *D.2.3. Infectividad de TEV-At17 en distintos ecotipos de Arabidopsis thaliana: efecto de la heterogeneidad genética de la población de huéspedes en la emergencia viral*

En un hipotético proceso de emergencia viral actúan varios factores entre los que destacan las elevadas tasas de mutación y recombinación virales, la sinergia entre diferentes especies de virus, la aparición de nuevos biotipos de vectores, la integración del genoma viral, la adaptación al huésped y/o la virulencia o severidad de los nuevos síntomas. Pero además, otro factor importante es la heterogeneidad genética de la población de huéspedes en los que se produce la aparición del nuevo virus. En el Capítulo 4 hemos abordado este problema explorando la capacidad del TEV ancestral y del TEV-At17 adaptado al ecotipo Ler-0 de *A. thaliana* de infectar otros ecotipos genéticamente diferenciados del Ler-0.

En el momento de iniciar este trabajo ya estaba bien descrito que distintos ecotipos de *A. thaliana* variaban en su grado de susceptibilidad a TEV y que esta diferencia en susceptibilidad era debida a la presencia del alelo dominante en el gen de *restricción de movimiento de TEV 1 (RTM1)* (Mahajan *et al.*, 1998; Chisholm *et al.*, 2000, 2001) y, eventualmente a la contribución del gen *RTM2* (Whitham *et al.*, 2000). Para explorar cual es el efecto de esta variación genética en la susceptibilidad a la infección, hemos evaluado la capacidad de TEV-At17 de infectar sistémicamente otros ocho ecotipos de *A. thaliana* (Alc-0, Col-0, Cvi-0, Oy-0, St-0, Ta-0, Tsu-0 y Ws-0). Para ello, se inocularon 16 plantas de cada ecotipo con TEV y otras tantas con TEV-At17. El diagnostico de la infección se realizó a partir de tejido caulinar a los 21 dpi y mediante hibridación de tipo Western con un anticuerpo comercial específico contra la CP y mediante RT-PCR en un solo paso.

La infectividad del virus TEV ancestral en los ecotipos Col-0, Alc-0, Cvi-0, Oy-0, Ta-0, Tsu-0, y Ws-0 fue nula, pero este genotipo viral sí infectó los ecotipos Ler-0 y St-0, con una infectividad del 90% y 75%, respectivamente. Cuando los mismos nueve ecotipos se inocularon con TEV-At17, se encontraron plantas infectadas en todos los casos, aunque la infectividad varió enormemente entre ecotipos. Así, clasificamos los ecotipos en tres categorías según el valor de infectividad que mostraban. El primer grupo de ecotipos

mostraban infectividades elevadas superiores a 88% (*Ler-0*, *St-0* y *Oy-0*). El segundo grupo lo constituían *Alc-0*, *Cvi-0* y *Tsu-0*, con valores de infectividad que oscilaron entre el 38% y 75% de las plantas inoculadas. Por último, el tercer grupo de ecotipos, más resistentes a la infección, está formado por *Col-0*, *Ws-0* y *Ta-0*, con valores de infectividad siempre inferiores al 19%.

Sorprendentemente, *Col-0* y *Ws-0* habían sido descritos como ecotipos portadores del alelo dominante *RTM1* y, por consiguiente, deberían ser completamente resistentes a la infección. Nuestra observación de que TEV-At17 puede infectar, aunque ciertamente con baja eficiencia, estos ecotipos abre la posibilidad de que este virus pudiese continuar su adaptación a los mismos. Desde un punto de vista más filosófico, queda cuestionada la generalidad de los resultados de otros autores sobre la existencia de un único determinante de resistencia en *A. thaliana* para la infección con TEV. Dicho de un modo más preciso: *Col-0* sí es resistente al clon de TEV empleado en aquellos experimentos (y aquí confirmado) pero no de manera universal a cualquier variante genético de TEV.

Los ecotipos *Ler-0* y *St-0*, presentan síntomas muy leves en el 100% de las plantas al ser infectados por el genotipo ancestral de TEV, siendo los síntomas en *St-0* algo más severos. Cuando los ecotipos *Cvi-0*, *Ler-0* y *St-0* son infectados con TEV-At17 se agudizan los síntomas. Estos ecotipos son semejantes en sus repuestas, pudiendo ser una consecuencia de que sus genotipos están más relacionados que los demás, además de que los ecotipos *Cvi-0* y *Ler-0* han sido descritos como portadores del gen recesivo de *rtm1*. En los ecotipos *Tsu-0*, *Ta-0*, *Alc-0* y *Oy-0* se observó una disminución en el crecimiento general de la planta tras la infección con TEV-At17. Con todo, estos datos deben ser tomados como preliminares y serán sometidos a un estudio más riguroso.

De forma general podemos concluir del Capítulo 4 que la heterogeneidad genética en una población de potenciales huéspedes no restringe necesariamente la capacidad de un virus emergente de expandirse en ella. Más aún, incluso si parte de esta variación genética tiene que ver con resistencia al virus emergente, como es el caso aquí del locus *RTM1*, es posible que el virus emergente haya adquirido propiedades biológicas que le permitan romper esta resistencia, al menos de un modo cuantitativo. Este resultado nos hace ser pesimistas sobre estrategias de control basadas en la introducción de genes de resistencia probados contra un único genotipo viral.



## CONCLUSIONES

---



## CONCLUSIONES

**A**l evolucionar experimentalmente TEV en dos huéspedes filogenéticamente muy próximos como son *N. tabacum* y *C. annuum* (ambas especies miembros de la familia *Solanaceae*), se observó que la carga viral y la virulencia de los linajes evolucionados en tabaco se mantuvieron estables a lo largo del tiempo, encontrándose que las poblaciones virales alteraban su capacidad de explotación del huésped alternativo pimiento. Por otra parte, los linajes evolucionados en pimiento sí aumentaron su carga viral y su virulencia en este huésped, a la par que disminuían su virulencia y carga viral en tabaco, en un claro ejemplo de evolución de la especialización ecológica. Estamos pues ante un ejemplo de compromiso adaptativo entre dos nichos ecológicos diferentes. Las bases moleculares de este compromiso, aunque no del todo claras, sí tienen que ver con la aparición de mutaciones que confieren una mayor eficacia a TEV en pimiento penalizando ésta en tabaco, siendo éste un caso de pleiotropía antagonista. Este efecto pleiotrópico antagónico podría ser un factor crucial para limitar la gama de huéspedes y promover la especialización viral.

Hemos estudiado el efecto que la infección de *A. thaliana* Ler-0 con TEV tiene sobre el transcriptoma de la planta. Se han observado una gran cantidad de genes cuya expresión está afectada por la infección, algunos de estos genes participan en el metabolismo primario y el ciclo celular y podrían ser los responsables de los síntomas leves característicos de las plantas infectadas. Las repuestas antivirales asociadas a la expresión de los genes *PDA4* y de la familia de las HSP pueden no ser específicas a TEV, sino una respuesta general de *A. thaliana* a la infección de cualquier virus. Este tipo de experimentos son importantes para dilucidar el resistoma de la planta.

La adaptación de TEV a *A. thaliana* Ler-0 provocó un cambio en la interacción entre la replicación del virus y los procesos fisiológicos del huésped. Por un lado, la adaptación a este nuevo huésped mejoró la acumulación y transmisibilidad del virus a la par que exacerbó los síntomas inducidos. Estos cambios fenotípicos correlacionaron con muy pocos cambios en el genoma viral, siendo solamente uno de ellos el responsable de desencadenar aparición de síntomas. Producto de la adaptación, el virus evita la expresión de los genes involucrados en la señalización de las rutas de estrés abiótico. Además, hemos encontrado que algunos procesos celulares básicos pueden estar compensando el consumo de recursos celulares asociados con la replicación viral.

La adaptación de TEV-*At17* al ecotipo *Ler-0* conlleva la capacidad por parte del virus de infectar otros ecotipos que no eran susceptibles a la infección con el virus ancestral. También se observaron síntomas en algunos ecotipos infectados con TEV-*At17*, posiblemente debido también al efecto que provoca la sustitución N1a-VPg, antes descrita.



## BIBLIOGRAFÍA

---



# BIBLIOGRAFÍA

- Adams MJ, Antoniwi JF, Beaudoin F. 2005. Overview and analysis of the polyprotein cleavage sites in the family *Potyviridae*. *Mol. Plant Pathol.* **6** : 471-487.
- Agudelo-Romero P y Elena SF. 2008. The degree of plant resilience to infection correlates with virus virulence and host-range. *Span. J. Agric. Res.* **6**: 160-169.
- Ali A, Li H, Schneider WL, Sherman DJ, Gray S, Smith D, Roossinck MJ. 2006. Analysis of genetic bottlenecks during horizontal transmission of *Cucumber mosaic virus*. *J. Virol.* **80**: 8345-8350.
- Alon U, Barkai N, Notterman DA, Gish K, Abarra S, Mack D, Levine AJ. 1999. Broad patterns of gene expression revealed by clustering analysis of tumor and normal colon tissues probed by oligonucleotide arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 6745-6750.
- Al-Shahrour F, Díaz-Uriarte R, Dopazo J. 2005. Discovering molecular functions significantly related to phenotypes by combining gene expression data and biological information. *Bioinformatics* **21**: 2988-2993.
- Aranda MA, Escaler M, Wang D, Maule AJ. 1996. Induction of HSP70 and polyubiquitin expression associated with plant virus replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 15289-15293.
- Ascencio-Ibáñez JT, Sozzani R, Lee T, Chu TM, Wolfinger RD, Cella R, Hanley-Bowdoin L. 2008. Global analysis of Arabidopsis gene expression uncovers a complex array of changes impacting pathogen response and cell cycle during Geminivirus infection. *Plant Physiol.* **148**: 436 - 454.
- Belshaw R, Gardner A, Rambaut A, Pybus OG. 2008. Pacing a small cage: mutation and RNA viruses. *Trends Ecol. Evol.* **23**: 188-193.
- Blanc S, Ammar ED, García-Lampasona S, Dolja VV, Llave C, Baker J, Pirone TP. 1998. Mutations in the potyvirus helper component protein: effects on interactions with virions and aphid stylets. *J. Gen. Virol.* **79**: 3119-3122.
- Blanc S, López-Moya JJ, Wang R, García-Lampasona S, Thornbury DW, Pirone TP. 1997. A specific interaction between coat protein and helper component correlates with aphid transmission of a potyvirus. *Virology* **231**: 141-147.
- Carrasco P, de la Iglesia F and Elena SF. 2007. The distribution of fitness and virulence effects caused by single-nucleotide substitutions in *Tobacco etch virus*. *J. Virol.* **81**: 12979-12984.
- Carrington JC, Haldeman R, Dolja VV, Restrepo-Hartwig MA. 1993. Internal cleavage and trans-proteolytic activities of the VPg-proteinase (Nla) of *Tobacco etch potyvirus in vivo*. *J. Virol.* **67**: 6995-7000.
- Carrington JC, Jensen PE, Schaad MC. 1998. Genetic evidence for an essential role for potyvirus CI protein in cell-to-cell movement. *Plant J.* **14**: 393-400.

- Carrington JC, Kasschau KD, Johansen LK. 2001. Activation and suppression of RNA silencing by plant viruses. *Virology* **281**: 1-5.
- Chao L. 1990. Fitness of RNA virus decreased by Muller's ratchet. *Nature* **348**: 454-455.
- Charron C, Nicolaï M, Gallois JL, Robaglia C, Moury B, Palloix A, Caranta C. 2008. Natural variation and functional analyses provide evidence for co-evolution between plant eIF4E and potyviral VPg. *Plant J.* **54**: 56-68.
- Chen W, Provart NJ, Glazebrook J, Katagiri F, Chang H, Eulgem T, Mauch F, Luan S, Zou G, Whitham SA, Budworth PR, Tao Y, Xie Z, Chen X, Lam S, Kreps JA, Harper JF, Si-Ammour A, Mauch-Mani B, Heinlein M, Kobayashi K, Hohn T, Dangl JL. 2002. Expression profile matrix of Arabidopsis transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *Plant Cell* **14** : 559-574.
- Chisholm ST, Mahajan SK, Whitham SA, Yamamoto ML, Carrington JC. 2000. Cloning of Arabidopsis *RTM1* gene, which controls restriction of long-distance movement of *Tobacco etch virus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 489-494.
- Chisholm ST, Parra MA, Anderberg RJ, Carrington JC. 2001. *RTM1* and *RTM2* genes function in phloem to restrict long-distance movement of *Tobacco etch virus*. *Plant Physiol.* **127**: 1667-1675.
- Choi IR, Horken KM, Stenger DC, French R. 2005. An internal RNA element in the P3 cistron of *Wheat streak mosaic virus* revealed by synonymous mutations that affect both movement and replication. *J. Gen. Virol.* **86**: 2605-2614.
- Cooper B. 2001. Collateral gene expression changes induced by distinct plant viruses during the hypersensitive resistance reaction in *Chenopodium amaranticolor*. *Plant J.* **26**: 339-349.
- Crill WD, Wichman HA, Bull JJ. 2000. Evolutionary reversals during viral adaptation to alternating hosts. *Genetics* **154**: 37-47.
- Cuevas JM, Elena SF, Moya A. 2002. Molecular basis of adaptive convergence in experimental populations of RNA viruses. *Genetics* **162**: 533-542.
- Daròs JA y Carrington JC. 1997. RNA binding activity of NIa proteinase of *Tobacco etch potyvirus*. *Virology* **237**: 336-336.
- Daròs JA, Schaad MC, Carrington JC. 1999. Functional analysis of the interaction between VPg-proteinase (NIa) and RNA polymerase (NIb) of *Tobacco etch potyvirus*, using conditional and suppressor mutants. *J. Virol.* **73**: 8732-8740.
- de la Iglesia F y Elena SF. 2007. Fitness declines in *Tobacco etch virus* upon serial bottleneck transfers. *J. Virol.* **81** : 4941-4947.
- de la Peña M, Elena SF, Moya A. 2000. Effect of deleterious mutation-accumulation on the fitness of RNA bacteriophage MS2. *Evolution* **54**: 686-691.

- de Wispelaere M, Gaubert S, Trouilloud S, Belin C, Tepfer M. 2005. A map of the diversity of RNA3 recombinants appearing in plants infected with *Cucumber mosaic virus* and *Tomato aspermy virus*. *Virology* **331**: 117-127.
- Domingo E y Holland JJ. 1997. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu. Rev. Microbiol.* **51**: 151-178.
- Domingo E. 2002. Quasispecies theory in virology. *J. Virol.* **76**: 463-465.
- Domingo E, Escarmís C, Baranowski E, Ruiz-Jarabo CM., Carrillo E, Núñez JI., Sobrino F. 2003. Evolution of *Foot-and-mouth disease virus*. *Virus Res.* **91**: 47-63.
- Drake JW y Holland JJ. 1999. Mutation rates among RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**: 13910-13913.
- Duarte E, Clarke D, Moya A, Domingo E, Holland J. 1992. Rapid fitness losses in mammalian RNA virus clones due to Muller's ratchet. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 6015-6019.
- Eigen M. 1971. Selforganization of matter and the evolution of biological macromolecules. *Naturwissenschaften* **58**: 465-523.
- Elena SF y Sanjuán R. 2007. Virus evolution: Insights from an experimental approach. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **38**: 27-52.
- Elena SF, Agudelo-Romero P, Carrasco P, Codoñer FM, Martín S, Torres-Barceló C, Sanjuán R. 2008. Experimental evolution of plant RNA viruses. *Heredity* **100**: 478-483.
- Elena SF, Carrasco P, Daròs JA, Sanjuán R. 2006. Mechanisms of genetic robustness in RNA viruses. *EMBO Rep.* **7**: 168-173.
- Elena SF, Ekunwe L, Hajela N, Oden SA, Lenski RE. 1998. Distribution of fitness effects caused by random insertion mutations in *Escherichia coli*. *Genetica* **102**: 346-358.
- Escaler M, Aranda MA, Thomas CL, Maule AJ. 2000. Pea embryonic tissues show common responses to the replication of a wide range of viruses. *Virology* **267**: 318-325.
- Escriu F, Fraile A, García-Arenal F. 2007. Constraints to genetic exchange support gene coadaptation in a tripartite RNA virus. *PLoS Pathog.* **3**: e8.
- Escriu F, Fraile A, García-Arenal F. 2000. Evolution of virulence in natural populations of the satellite RNA of *Cucumber mosaic virus*. *Phytopathology* **90**: 480-485.
- Freeman S y Herron J. 2002. Análisis evolutivo. Prentice Hall.
- Fregene M, Matsumura H, Akano A, Dixon A, Terauchi R. 2004. Serial analysis of gene expression (SAGE) of host-plant resistance to the Cassava mosaic disease (CMD). *Plant Mol. Biol.* **56**: 563-571.
- Fry JD. 1996. The evolution of host specialization: are trade-offs overrated? *Am. Nat.* **148**: S84-S107.

- Futuyma DJ y Moreno G. 1988. The evolution of ecological specialization. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **19**: 207-233.
- Geri C, Cecchini E, Giannakou ME, Covey SN, Milner JJ. 1999. Altered patterns of gene expression in *Arabidopsis* elicited by *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) infection and by a CaMV gene VI transgene. *Mol. Plant Microbe Interact.* **12**: 377-384.
- Glazebrook J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **43**: 205-227.
- Golem S y Culver JN. 2003. *Tobacco mosaic virus* induced alterations in the gene expression profile of *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant. Microb. Interact.* **16**: 681-688.
- Hahn CS, Lustig S, Strauss EG, Strauss JH. 1988. *Western equine encephalitis virus* is a recombinant virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 5997-6001.
- Hall JS, French R, Hein JL, Morris TJ, Stenger DC. 2001. Three distinct mechanisms facilitate genetic isolation of sympatric *Wheat streak mosaic virus* lineages. *Virology* **282**: 230-236.
- Hamilton MA, Russo RC, Thurston RV. 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Env. Sci. Technol.* **11**: 714-719.
- Havelda Z y Maule AJ. 2000. Complex spatial responses to *Cucumber mosaic virus* infection in susceptible *Cucurbita pepo* cotyledons. *Plant Cell* **12**: 1975-1986.
- Heath MC. 2000. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**: 315-319.
- Höhnle M, Hofer P, Bedford ID, Briddon RW, Markham PG, Frischmuth T. 2001. Exchange of three amino acids in the coat protein results in efficient whitefly transmission of a nontransmissible *Abutilon mosaic virus* isolate. *Virology* **290**: 164-170.
- Holmes EC y Moya A. 2002. Is the quasispecies concept relevant to RNA viruses? *J. Virol.* **76**: 460-465.
- Huang Z, Yeakley JM, Garcia EW, Holdridge JD, Fan JB, Whitham SA. 2005. Salicylic acid-dependent expression of host genes in compatible *Arabidopsis*-virus interactions. *Plant Physiol.* **137**: 1147-1159.
- Ishihara T, Sakurai N, Sekine KT, Hase S, Ikegami M, Shibata D, Takahashi H. 2004. Comparative analysis of expressed sequence tags in resistant and susceptible ecotypes of *Arabidopsis thaliana* infected with *Cucumber mosaic virus*. *Plant Cell Physiol.* **45**: 470-480.
- Itaya A, Matsuda Y, Gonzales RA, Nelson RS, Ding B. 2002. *Potato spindle tuber viroid* strains of different pathogenicity induces and suppresses expression of common and unique genes in infected tomato. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **15**: 990-999.
- Jenner CE, Wang X, Ponz F, Walsh JA. 2002. A fitness cost for *Turnip mosaic virus* to overcome host resistance. *Virus Res.* **86**: 1-6.

- Jockusch H, Wiegand C, Mersch B, Rajes D. 2002. Mutants of *Tobacco mosaic virus* with temperature-sensitive coat proteins induce heat shock response in tobacco leaves. *Mol. Plant Microbe Interact.* **14**: 914-917.
- Jones JDG y Dangl JL. 2006. The plant immune system. *Nature* **444**: 323-329.
- Kasschau KD, Xie Z, Allen E, Llave C, Chapman EJ, Krizan KA, Carrington JC. 2003. P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA function. *Dev. Cell* **4**: 205-217.
- Kawecki TJ. 1994. Accumulation of deleterious mutations and the evolutionary cost of being a generalist. *Am. Nat.* **144**: 833-838.
- Kempema LA, Cui X, Holzer FM, Walling LL. 2007. Arabidopsis transcriptome changes in response to phloem-feeding silverleaf whitefly nymphs. Similarities and distinctions in responses to aphids. *Plant Physiol.* **143**: 849-865.
- Kilian J, Whitehead D, Horak J, Wanke D, Weinl S, Batistic O, D'Angelo C, Bornberg-Bauer E, Kudla J, Harter K. 2007. The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. *Plant J.* **50**: 347-363.
- Li H y Roossinck MJ. 2004. Genetic bottlenecks reduce population variation in an experimental RNA virus population. *J. Virol.* **78**: 10582-10587.
- Li XH, Valdez P, Olvera RE, Carrington JC. 1997. Functions of the *Tobacco etch virus* RNA polymerase (NIb): subcellular transport and protein-protein interaction with VPg/proteinase (NIa). *J. Virol.* **71**: 1598-1607.
- Lipsitch M, Siller S, Nowak MA. 1996. The evolution of virulence in pathogens with vertical and horizontal transmission. *Evolution* **50**: 1729-1741.
- Mahajan S, Dolja VV, Carrington JC. 1996. Roles of the sequence encoding *Tobacco etch virus* capsid protein in genome amplification: requirements for the translation process and a cis-active element. *J. Virol.* **70**: 4370-4379.
- Mahajan SK, Chisholm ST, Whitham SA, Carrington JC. 1998. Identification and characterization of a locus (*RTM1*) that restricts long-distance movement of *Tobacco etch virus* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **14**: 177-186.
- Manrubia SC y Lázaro E. 2006. Viral evolution. *Phys. Life Rev.* **3**: 65-92.
- Marathe R, Guan Z, Anandalakshmi R, Zhao H, Dinesh-Kumar SP. 2004. Study of *Arabidopsis thaliana* resistome in response to *Cucumber mosaic virus* infection using whole genome microarray. *Plant Mol. Biol.* **55**: 501-520.
- Mayer MP. 2005. Recruitment of Hsp70 chaperones: a crucial part of viral survival strategies. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **153**: 1-46.
- Müller HJ. 1964. The relation of recombination to mutational advance. *Mutat. Res.* **106**: 1-9.

- Novella IS. 2003. Contributions of *Vesicular stomatitis virus* to the understanding of RNA virus evolution. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**: 399-405.
- Novella IS, Clarke DK, Quer J, Duarte EA, Lee CH, Weaver SC, Elena SF, Moya A, Domingo E, Holland JJ. 1995. Extreme fitness differences in mammalian and insect hosts after continuous replication of *Vesicular stomatitis virus* in sandfly cells. *J. Virol.* **69**: 6805-6809.
- Pernas M, García-Casado G, Rojo E, Solano R, Sánchez-Serrano JJ. 2007. A protein phosphatase 2A catalytic subunit is a negative regulator of abscisic acid signalling. *Plant J.* **51**: 763-778.
- Pfeiffer JK y Kirkegaard K. 2003. A single mutation in poliovirus RNA-dependent RNA polymerase confers resistance to mutagenic nucleotide analogs via increased fidelity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 7289-7294
- Pierrugues O, Guilbaud L, Fernandez-Delmond I, Fabre F, Tepfer M, Jacquemond M. 2007. Biological properties and relative fitness of inter-subgroup *Cucumber mosaic virus* RNA 3 recombinants produced in vitro. *J. Gen. Virol.* **88**: 2852-2861.
- Pompe-Novak M, Gruden K, Baebler S, Krecic-Stres H, Kovac M, Jongsma M, Ravnkar M. 2006. *Potato virus Y* induced changes in the gene expression of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **67**:237-247.
- Remold SK, Rambaut A, Turner PE. 2008. Evolutionary genomics of host adaptation in *Vesicular stomatitis virus*. *Mol. Biol. Evol.* **25**: 1138-1147.
- Reves F, Le Gall O., Candresse T, Maule A. 1999. New advances in understanding the molecular biology of plant/potyvirus interactions. *Mol. Plant Microbe Interact.* **12**: 367-376.
- Rico P, Ivars P, Elena SF, Hernández C. 2006. Insights into the selective pressures restricting *Pelargonium flower break virus* genome variability: evidence for host adaptation. *J. Virol.* **80**: 8124-8132.
- Riechmann JL, Lain S, García JA. 1992. Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *J. Gen. Virol.* **73**: 1-16.
- Rojo E, Solano R., Sánchez-Serrano JJ. 2003. Interactions between signaling compounds involved in plant defense. *J. Plant Growth Regul.* **22**: 82-98.
- Ross OA, Braithwaite AT, Skipper LM, Kachergus J, Hulihan MM, Middleton FA, Nishioka K, Fuchs J, Gasser T, Maraganore DM, Adler CH, Larvor L, Chartier-Harlin MC, Nilsson C, Langston JW, Gwinn K, Hattori N, Farrer MJ. 2008. Genomic investigation of alpha-synuclein multiplication and parkinsonism. *Ann. Neurol.* **63**: 743-750.
- Sacristán S, Fraile A, Malpica JM, García-Arenal F. 2005. An Analysis of host adaptation and its relationship with virulence in *Cucumber mosaic virus*. *Virology* **95**: 827-833.
- Sacristán S y García-Arenal F. 2008. The evolution of virulence and pathogenicity in plant pathogen populations. *Mol. Plant Pathol.* **9**: 369-384.



- Sacristán S, Malpica JM, Fraile A, García-Arenal F. 2003. Estimation of population bottlenecks during systemic movement of *Tobacco mosaic virus* in tobacco plants. *J. Virol.* **77**: 9906-9911.
- Senthil G, Liu H, Puram VG, Clark A, Stromberg A, Goodin MM. 2005. Specific and common changes in *Nicotiana benthamiana* gene expression in response to infection by enveloped viruses. *J Gen Virol.* **86**: 2615-2625.
- Shaner G, Stromberg EL, Lacy GH, Barker KR, Pirone TP. 1999. Nomenclature and concepts of pathogenicity and virulence. *Annu. Rev. Phytopathol.* **30**: 47-66.
- Shukla DD, Ward CW, Brunt AA. 1994. The *Potyviridae*. CAB International.
- Silander OK, Weinreich DM, Wright KM, O'Keefe KJ, Rang CU, Turner PE, Chao L. 2005. Widespread genetic exchange among terrestrial bacteriophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 19099-19114.
- Stewart AD, Logsdon Jr GM, Kelley SE. 2005. An empirical study of the evolution of virulence under both horizontal and vertical transmission. *Evolution* **59**: 730-739.
- Stracke R, Werber M, Weisshaar B. 2001. The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**: 447-456.
- Suehiro N, Natsuaki T, Watanabe T, Okuda S. 2004. An important determinant of the ability of *Turnip mosaic virus* to infect *Brassica spp.* and/or *Raphanus sativus* is in its P3 protein. *J Gen. Virol.* **85**: 2087-2098.
- Ton J y Mauch-Mani B. 2004. Beta-amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose. *Plant J.* **38**: 119-130.
- Torres-Barceló C, Martín S, Daròs JA, Elena SF. 2008. From hypo- to hypersuppression: effect of amino acid substitutions on the RNA-silencing suppressor activity of the *Tobacco etch potyvirus* HC-Pro. *Genetics* **180**: 1039-1049.
- Torres-Zabala M, Truman W, Bennett MH, Lafforgue G, Mansfield JW, Rodriguez Egea P, Bogre L, Grant M. 2007. *Pseudomonas syringae* pv. tomato hijacks the *Arabidopsis abscisic acid* signalling pathway to cause disease. *EMBO J.* **26**: 1434-1443.
- Trinks D, Rajeswaran R, Shivaprasad PV, Akbergenov R, Oakeley EJ, Veluthambi K, Hohn T, Pooggin MM. 2005. Suppression of RNA silencing by a geminivirus nuclear protein, AC2, correlates with transactivation of host genes. *J. Virol.* **79**: 2517-2527.
- Turner PE y Elena SF. 2000. Cost of host radiation in an RNA virus. *Genetics* **156**: 1465-1470.
- Urcuqui-Inchima S, Haenni AL, Bernardi F. 2001. Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus Res.* **74**: 157-175.
- Vailleau F, Daniel X, Tronchet M, Montillet JL, Triantaphylides C, Roby D. 2002. A R2R3-MYB gene, AtMYB30, acts as a positive regulator of the hypersensitive cell death program in plants in response to pathogen attack. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 10179-10184.

- van Opijnen T, de Ronde A, Boerlijst MC, Berkhout B. 2007. Adaptation of HIV-1 depends on the host-cell environment. *PLoS ONE* **2**: e271.
- Ventelon-Debout M, Delalande F, Brizard JP, Diemer H, Van Dorsselaer A, Brugidou C. 2004. Proteome analysis of cultivar-specific deregulations of *Oryza sativa* indica and *O. sativa* japonica cellular suspensions undergoing *Rice yellow mottle virus* infection. *Proteomics* **4**: 216-225.
- Verchot J y Carrington JC. 1995. Evidence that the potyvirus P1 proteinase functions in trans as an accessory factor for genome amplification. *J. Virol.* **6**: 3668-3674.
- Wang RY, Ammuar ED, Thornbury DW, Lopez-Moya JJ, Pirone TP. 1996. Loss of potyvirus transmissibility and helper-component activity correlate with non-retention of virions in aphid stylets. *J. Gen. Virol.* **77**: 861-867.
- Wang D y Maule AJ. 1995. Inhibition of host gene expression associated with plant virus replication. *Science* **267**: 229-231.
- Whitham SA, Anderberg RJ, Chisholm ST, Carrington JC. 2000. Arabidopsis *RTM2* gene is necessary for specific restriction of *Tobacco etch virus* and encodes an unusual small heat shock-like protein. *Plant Cell* **12**: 569-582.
- Whitham SA, Quan S, Chang HS, Cooper B, Estes B, Zhu T, Wang X, Hou YM. 2003. Diverse RNA viruses elicit the expression of common sets of genes in susceptible *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant J.* **33**: 271-283.
- Whitham SA, Yang C, Goodin MM. 2006. Global impact: elucidating plant responses to viral infection. *Mol. Plant Microbe Interact.* **19**: 1207-1215.
- Wichman HA, Badgett MR, Scott LA, Boulianne CM, Bull JJ. 1999. Different trajectories of parallel evolution during viral evolution. *Science* **285**: 422-424.
- Whithock MC. 1996. The Red Queen beats the jack-of-all-trades: the limitations on the evolution of phenotypic plasticity and niche breadth. *Am. Nat.* **148**: S65-S77.
- Woolhouse ME, Taylor LH, Haydon DT. 2001. Population biology of multihost pathogens. *Science* **11**: 1109-1112.
- Xiong L, Lee MW, Qi M, Yang Y. 2001. Identification of defense-related rice genes by suppression subtractive hybridization and differential screening. *Mol. Plant Microbe Interact.* **14**: 685-692.
- Yang C, Jie F, Nettleton D, Peng J, Carr T, Yeakley JM, Fan JB, Whitham SA. 2007. Spatial analysis of *Arabidopsis thaliana* gene expression in response to *Turnip mosaic virus* infection. *Mol. Plant Microbe Interact.* **20**: 358-370.
- Yuste E, Bordería AV, Domingo E, López-Galíndez C. 2005. Few mutations in the 5' leader region mediate fitness recovery of debilitated human immunodeficiency type 1 viruses. *J. Virol.* **79**: 5421-5427.

- Yuste E, López-Galíndez C, Domingo E. 2000. Unusual distribution of mutations associated with serial bottleneck passages of *Human immunodeficiency virus* type 1. *J. Virol.* **74**: 9546–9552.
- Yuste E, Sánchez-Palomino S, Casado C, Domingo E, López-Galíndez C. 1999. Drastic fitness loss in *Human immunodeficiency virus* type 1 upon serial bottleneck events. *J. Virol.* **73**: 2745–2751.
- Zhao J, Davis LC, Verpoorte R. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* **23**: 283-283.